VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

УДК [576.3:582.28](075.8)
ББК 28.55я73-1
К19

Издано при финансовой поддержке
Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Печатается по решению Ученого Совета
Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Рецензенты:
Заслуженный профессор Московского университета Ю.Т. Дьяков,
профессор О.Л. Коломиец

Камзолкина О.В., Дунаевский Я.Е. Биология грибной клетки: Учебное пособие. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2015. 239 с., 8 цв. вкл.

Впервые подготовлен к публикации на русском языке учебник, посвященный различным аспектам биологии грибной клетки. Учебник базируется на лекционных курсах «Цитология грибов» и «Физиология и биохимия грибов», читаемых авторами много лет студентам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. В предлагаемом учебнике представлен обширный материал, базирующийся на классических и современных представлениях в области микологии, цитологии, биохимии и генетики, дополненный собственными исследованиями авторов. В учебнике дается исчерпывающая и многосторонняя характеристика основных структур грибной клетки, их функций в процессе роста и развития мицелиальных и одноклеточных грибов, рассмотрены основные вопросы метаболизма грибов, изложены современные представления о жизни и смерти грибной клетки. Подробно рассматриваются вопросы поляризованного роста мицелиальных грибов и дрожжей, особенности цитокинеза и формирование септ, участие цитоскелета в морфогенезе грибов, роль альтернативного дыхания грибов, особенности структуры анаэробных грибов, сравнение апоптотического аппарата грибов с высшими эукариотами. Особое внимание уделено структуре ядерного аппарата, особенностям митоза и мейоза у грибов. В учебнике приведено много иллюстраций в виде фотографий и схем, что значительно облегчает восприятие материала.
Учебное пособие предназначено для студентов старших курсов, аспирантов и преподавателей Биологических факультетов университетов, педагогических, сельскохозяйственных и медицинских институтов, а также сотрудникам научно-исследовательских институтов, работающих в области молекулярной биологии, биохимии и генетики микроорганизмов, а также в области различных направлений прикладной микологии и микробиологии.

ISBN 978-5-9906564-1-3
© Камзолкина О.В., Дунаевский Я.Е., текст, иллюстрации, 2015
© Товарищество научных изданий КМК, издание, 2015

ПРЕДИСЛОВИЕ

Идея создания учебника по биологии грибной клетке возникла у авторов несколько лет назад, однако ее развитие тормозилось недостаточностью или неоднозначностью информации для написания многих разделов.

Грибы в 1969 г. были выделены Робертом Уиттекером в отдельное царство эукариотических организмов, что повлекло за собой их всестороннее изучение с различных позиций, включая систематику и морфологию, физиологию и цитологию, биохимию и молекулярную биологию. Кроме того, сильно выросло прикладное значение грибов, используемых для нужд сельского хозяйства, легкой, пищевой и фармацевтической промышленности; не прекращаются попытки увеличения эффективности применения грибов для уменьшения загрязнения окружающей среды, производства энергии, получения различных белков. Широкое использование грибов привело к тому, что микологические знания требуются теперь представителям самых разнообразных профессий, работающих с грибами или продуктами их метаболизма. Все это обуславливает осознание необходимости обобщения накопленных данных, касающихся цитологических, физиологических и биохимических аспектов жизнедеятельности грибной клетки. Следует отметить, что в отличие от растений и животных грибы еще недостаточно хорошо изучены на клеточном уровне. Несмотря на то, что дрожжи и ряд мицелиальных грибов являются удобными модельными объектами в исследовании структуры и процессов развития и старения, протекающих в эукариотической клетке, доказательства многих гипотез были получены совсем недавно с использованием новых методических приемов и современных приборов. Изучение везикулярного транспорта на почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* были завершены и удостоены Нобелевской премии в 2013 году. Исследования, начатые с изучения строения клетки, перешли на молекулярно-генетический и биохимический уровни. Так, например, первые работы по митозу у грибов начались с середины XX века на уровне светового микроскопа (Aist, 1969), через несколько лет они перешли на уровень электронного микроскопа (Aist, Bayles, 1991), а в настоящее время дополнились изучением генетически модифицированных штаммов, маркированных флуоресцентными зондами с последующим наблюдением цитоскелета клетки и ДНК в конфокальном (лазерном) микроскопе (Straube et al., 2005). Новые перспективы открывает наноскоп, позволяющий наблюдать перемещение отдельных молекул.

Материалы учебника построены на многолетних исследованиях авторов в области цитологии и биохимии грибов, а также на курсах лекций для студентов кафедры микологии и альгологии «Цитология грибов» и «Физиология и биохимия грибов».

Авторы не претендуют на исчерпывающую информацию по разделам, изложенным в учебнике. Нами была сделана лишь попытка взвешенно и критично оценить и систематизировать известные к настоящему времени сведения о строении и функции грибных органелл, метаболизме грибной клетки и молекулярных механизмах его регуляции. Мы вполне отдаем себе отчет, что дальнейшее развитие микологии может приводить к появлению новых знаний, подтверждающих или, наоборот, опровергающих существующие на сегодняшний день концепции и гипотезы.

Авторы выражают благодарность учителям и коллегам, без участия которых публикация учебного пособия не могла состояться: профессору Ю.Т.Дьякову, профессору Т.А.Белозерской, коллегам И.С.Мажейка, О.В.Штаер, О.А.Кудрявцевой, а также сотруд-

никам межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Н.Я.Агалаковой, А.Г.Богданову и ее заведующему Г.Н.Давидовичу.

Постоянно возникающие вопросы наших коллег из разных научно-исследовательских институтов, а также аспирантов и студентов, касающиеся цитологии и биологии грибной клетки, как и отсутствие соответствующей литературы на русском языке стали той движущей силой, что позволила довести написанный учебник до публикации.

Многие иллюстрации подготовлены авторами учебника. Система грибов представлена по базе данных Index Fungorum 2014.

Экспериментальные исследования выполнялись при поддержке грантов РФФИ и программы Приоритетные направления исследований МГУ имени М.В.Ломоносова.

Глава 1.
ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА ГРИБОВ (ПЛАЗМАЛЕММА)[1]

1.1. Общая характеристика

Плазматическая (цитоплазматическая) мембрана — обязательный компонент любой клетки. Она ограничивает клетку и обеспечивает сохранение существующих различий между клеточным содержимым и окружающей средой. Мембрана служит высокоизбирательным «входным» селективным фильтром и отвечает за активный транспорт веществ в клетку и из нее, обеспечивает диффузионный барьер.

Цитоплазматическую мембрану эукариотической клетки обычно называют плазмалеммой. Она представляет собой липидный бислой примерно 7,5 нм толщиной с большим количеством белков (рис. 1).

1.2. Функции плазмалеммы

Контроль поглощения и секреции веществ

В плазмалемме находятся множество транспортных систем: ионные каналы, белки-переносчики и ионные насосы, которые участвуют в селективном транспорте ионов внутрь клетки и наружу.

Через плазмалемму происходит также перенос макромолекул. Так, в периплазматическое пространство транспортируются строительные блоки клеточной стенки — полисахариды и структурные белки. Эти соединения обычно находятся в везикулах аппарата Гольджи и высвобождаются из них путем экзоцитоза.

Запасание и использование энергии

Плазмалемма любой клетки является *энергизованной* мембраной, т.е. на ней существует градиент электрохимического потенциала $\Delta\mu_{H}$, который используется для выполнения полезной работы, прежде всего для активного переноса веществ через мембрану.

Размещение и обеспечение работы ферментов

В плазмалемме находится множество ферментов: ферменты построения клеточной стенки (хитинсинтаза, глюкансинтаза), ферменты сигнальных систем и др. Активность хитинсинтазы, которая очень высокая в очищенных препаратах плазматической мембраны грибов,

---

[1] Сокращения

ДАГ — диацилглицерин

ФХ — фосфатидилхолин

ФЭ — фосфатидилэтаноламин

ФС — фосфатидилсерин

ФИ — фосфатидилинозит

ЦДФ — цитидиндифосфат

ЦТФ — цитидинтрифосфат

используется как маркер плазматической мембраны при субклеточном фракционировании. Фермент явно связан с липидным бислоем мембраны. Удаление фосфолипидов инактивировало фермент, тогда как добавление фосфолипидов восстанавливало активность частично инактивированного препарата хитинсинтазы.

Рецепторные функции

Многие белки плазмалеммы являются рецепторами различных сигналов. Плазмалемма клетки — это комплекс различных рецепторов эндогенных сигналов и внешних воздействий (рецепторы физических факторов — температуры, соли, pH и др.) Температура и засоленность изменяют текучесть мембраны. Изменение этих свойств плазмалеммы приводит к открытию или закрытию находящихся в ней механосенсорных ионных каналов. Таким образом, плазмалемма является местом рецепции (восприятия) различных сигналов химической и физической природы.

Сигнальная функция

Многие компоненты плазмалеммы после восприятия сигналов служат источником вторичных *мессенджеров* — молекул, которые «передают» сигнал по эстафете и усиливают его. В качестве вторичных мессенджеров выступают инозитол-1,4,5-трифосфат, диацилглицерин, фосфатидная кислота, продукты перекисного окисления липидов мембран. Все эти соединения образуются из липидов плазмалеммы под действием специальных ферментов, активируемых в результате воздействия сигнала на рецепторы. Таким образом, плазматическая мембрана является местом не только рецепции сигналов, но также их усиления и дифференцирования.

Функциональные особенности плазмалеммы

1. Градиент электрохимического потенциала плазматической мембраны создается за счет активного переноса сопрягающего иона с одной стороны мембраны на другую. Для плазмалеммы грибной клетки сопрягающим ионом выступает H^+, тогда как для цитоплазматической мембраны животной клетки это Na^+. Очевидно, что ферменты, которые за счет гидролиза АТФ активно «выкачивают» сопрягающий ион из клетки, у различных таксонов могут быть разными: у грибной клетки — H^+-АТФаза *p*-типа, у животной клетки — K^+/Na^+-АТФаза.
2. У грибной клетки одна из составляющих электрохимического потенциала мембраны — электрическая разность потенциалов находится в пределах около 200 мВ (у *Neurospora crassa*), что существенно выше, чем у животной клетки.

1.3. Белки плазмалеммы

Белки, представленные разнообразными ферментами, транспортными биомолекулами, рецепторами, порами и каналами, вносят существенный вклад в формирование структуры клеточных мембран. Среднее содержание белков в мембранах составляет примерно 60% (по массе сухого вещества).

Мембраны при нормальной температуре не имеют жесткой структуры, а обладают свойствами двумерных жидкостей. Компоненты мембран, включая белки, могут перемещаться в пределах своего слоя. Все это описывается жидкостно-мозаичной моделью структуры мембраны Сингера и Николсона, где мозаичность определяется тем, что белки не присутствуют на всем ее протяжении, а расположены в виде отдельных островков (рис. 1).

Мембранные белки могут испытывать затруднения в своем перемещении по бислою, обусловленные тем, что они могут образовывать ассоциации с другими белками, с элементами цитоскелета клеток или внеклеточным матриксом. Важной особенностью структуры мембран является также асимметричное расположение в ней белков.

Белки могут связываться с мембраной различными путями: периферические белки ассоциированы лишь с одной из поверхностей мембраны, удерживаются на мембране с помощью липидного «якоря» либо за счет нековалентных взимодействий с другими мемб-

ранными белками, тогда как погружённые (интегральные) белки насквозь пронизывают липидный бислой и образуют трансмембранную спираль (рис. 1).

Плазматическая мембрана включает белки, участвующие в переносе растворенных веществ, сигнальной трансдукции, закреплении цитоскелета клеток и синтезе компонентов клеточной стенки.

Кроме белков, в состав мембран входят липиды — около 30% и углеводы — до 10%. Углеводы в мембране присутствуют не в качестве самостоятельных компонентов, а как составная часть белков (гликопротеины) или липидов (гликолипиды). Все углеводы плазматической мембраны расположены на наружной ее поверхности. Они встроены в мембраны клеток и участвуют в распознавании внешних сигналов, межклеточной коммуникации, транспорте через мембраны; некоторые О-связанные гликаны обеспечивают поддержание структуры и стабильности белков плазмалеммы.

1.4. Липиды плазмалеммы

Отличительной чертой липидов плазматической мембраны является их разнообразие в составе и размерах. Основные липиды относятся к классам фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов и стеринов (рис. 2).

Фосфолипиды и сфинголипиды представляют собой амфифильные молекулы, содержащие гидрофильную «голову» и длинный гидрофобный «хвост». В составе плазматической мембраны они собраны в бислой. С любой стороны мембранного бислоя наружу направлены гидрофильные «головы», тогда как гидрофобные «хвосты» спрятаны от водного окружения внутри мембраны.

Среди фосфолипидов у грибов наиболее представлены фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ), в меньших количествах присутствуют фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилинозит (ФИ). Так, в плазматической мембране *N. crassa* доля ФХ составляет 46%, ФЭ — 39%, ФИ — 15%, а ФС менее 1%. В клетках *N. crassa* и *Saccharomyces cerevisiae* большинство ФХ синтезируется тремя последовательными шагами метилирования ФЭ с S-аденозилметионином в качестве метильного донора. В свою очередь, большинство ФЭ синтезируется декарбоксилированием ФС. Этот путь резко отличается от главного пути (путь Кеннеди) синтеза ФХ и ФЭ у большинства других эукариот, где основания холин и этаноламин сначала фосфорилируются и затем реагируют с цитидинтрифосфатом (ЦТФ), давая ЦДФ-холин и ЦДФ-этаноламин, которые далее взаимодействуют с диацилглицерином (ДАГ) с выходом ФХ и ФЭ соответственно. Путь Кеннеди также встречается и у грибов, но он, явно, менее важен, чем путь, включающий последовательное метилирование. Возможно, этим можно объяснить избирательную токсичность для грибов органофосфорных фунгицидов эдифенфоса и ипробенфоса, которые ингибируют формирование ФХ метилированием. ФИ и ФС синтезируются из фосфатидной кислоты через ЦДФ-диацилглицерин, реагирующим с инозитом и стерином соответственно. Этот финальный шаг в синтезе ФИ является местом действия антибиотика валидомицина.

Сфинголипиды состоят из одной жирной кислоты, одной полярной головной группы и длинноцепочечного аминоспирта сфингозина, образованного конденсацией аминокислоты серина с другой молекулой жирной кислоты. Этот тип сфинголипида называется церамид, а если в качестве его полярной группы присутствует сахар, то цереброзид. Сфинголипиды принимают участие в передаче сигнала на плазматической мембране и составляют около 30% от общего содержания фосфолипидов.

Основными жирными кислотами у этих групп липидов мицелиальных грибов являются пальмитиновая ($C_{16\text{-}0}$) и семейство C_{18} кислот — стеариновая ($C_{18\text{-}0}$), олеиновая ($C_{18\text{-}1}$), линолевая ($C_{18\text{-}2}$) и линоленовая ($C_{18\text{-}3}$). Олеиновая кислота ($C_{18\text{-}1}$) и пальмитолеиновая кислота ($C_{16\text{-}1}$),

Фосфатидная кислота

Фосфатидилхолин $N(CH_3)_3—CH_2—CH_2—O—$

Фосфатидилэтаноламин $NH_2—CH_2—CH_2—O—$

Фосфатидилсерин $NH_2—CH(CO_2^-)—CH_2—O—$

Фосфатидилглицерин $CH_2OH—CH(OH)—CH_2—O—$

Фосфатидилинозитол

Кардиолипин

Эргостерол

Инозитолфосфат церамида

Маннозил инозитолфосфат церамида

Маннозил диинозитолфосфат церамида

Рис. 2. Липиды плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* (Rest et al., 1995).

вместе со следовыми количествами пальмитиновой кислоты ($C_{16\text{-}0}$) и стеариновой кислоты ($C_{18\text{-}0}$) — основные жирные кислоты у дрожжей *S. cerevisiae*. Присутствие тех или иных жирных кислот в составе фосфолипидов коррелирует с эволюционными взаимосвязями грибов: у Ascomycota и Basidiomycota углеводородный хвост имеет четное число углеродных атомов и либо насыщен, либо мононенасыщен; у Chytridiomycota и Zygomycota обнаруживается больше жирных кислот с нечетным количеством углеродов, причем большинство из них полиненасыщены.

Важными компонентами грибных мембран являются стерины, они служат для регуляции текучести мембран, активности мембраносвязанных ферментов и транспортных механизмов. У растений наиболее распространенные стерины плазмалеммы — стигмастерин, ситостерол и кампестерол, у клеток животных холестерин, пероноспоровые (из оомицетов/псевдогрибов) вообще не способны к синтезу стеринов и используют стерины растений хозяев, а сапрлегниевые (представители оомицетов) имеют фукостерин, как и бурые водоросли, и ланостерин (общий для грибов и животных). В то же время у большинства грибов главный стерин плазмалеммы — эргостерин (за исключением Chytridiomycota, у которых доминантный стерин холестерин). Для плазматической мембраны *N. crassa* эргостерин составляет 95% содержания всех стеринов, доля которых в составе общих мембранных липидов — 22%. Различие в основных стеринах плазмалеммы грибов и клеток млекопитающих легло в основу создания и применения двух классов противогрибных препаратов, полиенов и азолов. Соединения первой группы, к которым относятся нистатин и амфотерицин В, прямо встраиваются в плазматическую мембрану через гидрофобное взаимодействие с эргостерином, что приводит к образованию пор и утечке клеточного содержимого. Ко второй группе относятся азолы и аллиламины, препятствующие синтезу плазматической мембраны через ингибирование биосинтеза эргостерина.

Фосфолипиды и стерины составляют скелет мембраны и отвечают за целостность мембранной структуры. Липиды плазматической мембраны достаточно активно перемещаются в пределах своего монослоя, но возможны и их переходы из одного монослоя в другой. Такой переход, называемый «флип-флоп» (от англ. *flip-flop «шлеп-шлеп»*), осуществляется ферментом флипазой. Липиды асимметрично расположены в бислое плазмалеммы. Так, внутренний слой плазматической мембраны *S. cerevisiae* обогащен ФЭ, ФИ и ФС, тогда как в наружном слое преобладает ФХ.

Мембранные липиды играют важную роль в адаптации клеток грибов к стрессам. Сохранение функционального состояния мембран необходимо при любом стрессорном воздействии. Предложена гипотеза, согласно которой гиперосмотические условия, как и воздействие холода, приводят к повышению вязкости мембран, а гипоосмотические условия и тепловые воздействия вызывают ее снижение. Полагают, что основными факторами, влияющими на вязкость липидного бислоя, являются степень ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, и соотношение стерины/фосфолипиды. С увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот и снижением соотношения стеринов к фосфолипидам происходит увеличение текучести мембраны.

1.5. Пассивный и активный транспорт в мембранах

Одна из важнейших функций плазматической мембраны — ее участие в транспорте различных веществ. Липопротеиновая структура плазматической мембраны делает ее эффективным барьером для перемещения большинства молекул. Те молекулы, которые могут преодолевать этот барьер, обладают определенными специальными свойствами, такими как величина, форма или растворимость. Их транспорт через мембрану можно разделить на два основных типа: пассивный и активный (рис. 3).

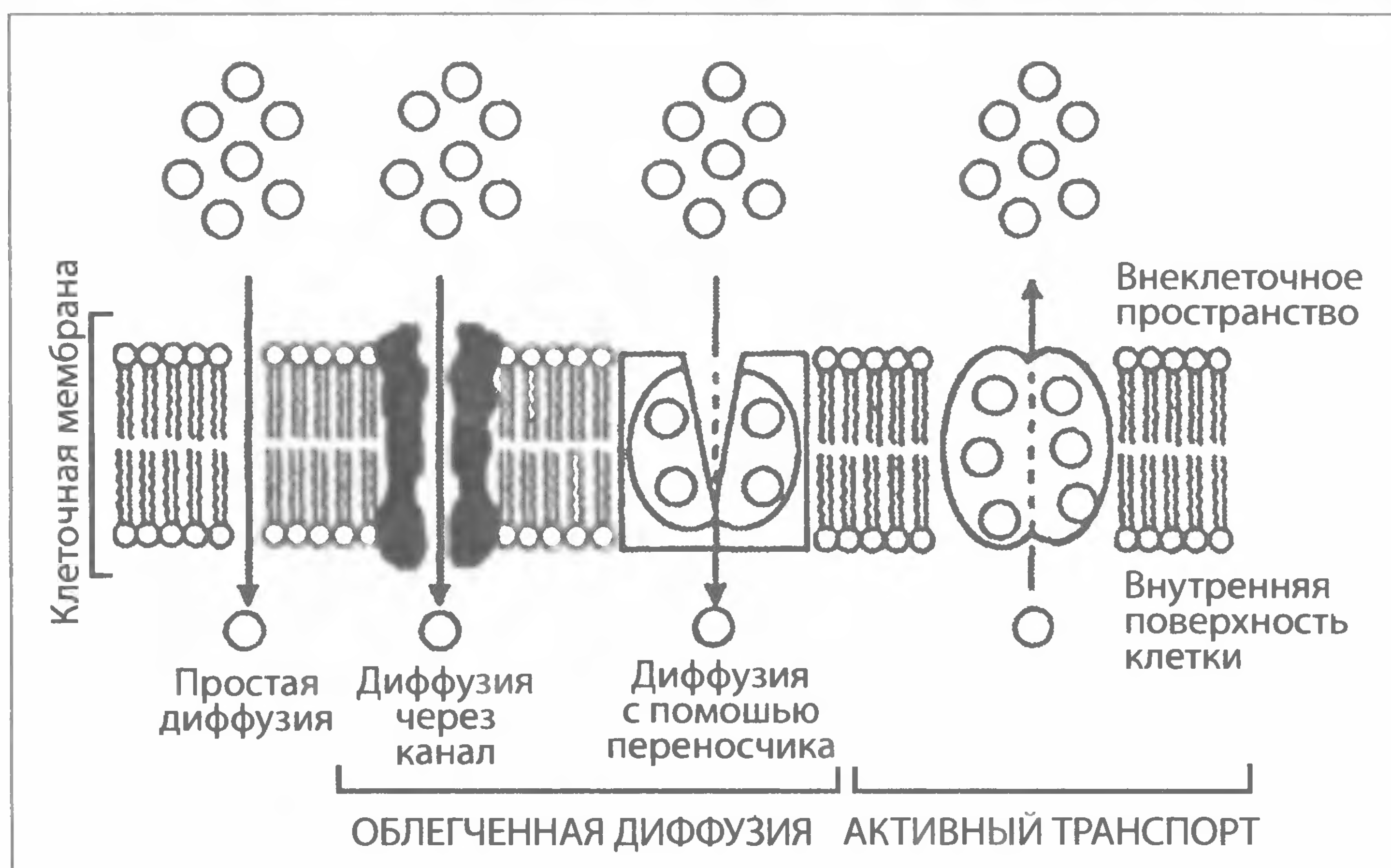


Рис. 3. Пассивный и активный транспорт через плазматическую мембрану.

Виды мембранного транспорта:

Пассивный транспорт (диффузия, осмос) — перенос молекул (глюкоза, вода, мочевина) и ионов по градиенту химического (μ) или электрохимического ($\widetilde{\mu}$) потенциалов или перенос молекул из мест с большей концентрацией вещества в места с меньшей концентрацией вещества. Пассивный транспорт происходит спонтанно и не требует свободной энергии АТФ.

Виды диффузии (рис. 3):

Простая (перенос молекул газов O_2, CO_2, молекул H_2O и т.д.) представляет собой самопроизвольное перемещение веществ из мест с большей их концентрацией в места с меньшей концентрацией вследствие хаотического теплового движения частиц;

Облегченная — осуществляется по градиенту химического (электрохимического) потенциала с участием белка-переносчика. Три принципиальных критерия отличают облегченную диффузию от обычной:

1. Облегченная диффузия насыщаема — при увеличении концентрации вещества с одной стороны мембраны плотность потока переносимого вещества возрастает лишь до некоторого предела, обусловленного тем, что все переносчики переносимого вещества оказываются заняты;
2. Облегченная диффузия специфична — каждый класс соединений (сахара, аминокислоты, витамины и т.д.) имеет свои переносящие белки, внутри каждого класса могут быть специфические переносчики для различных стереохимических групп. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* имеются две переносящие системы для облегченной диффузии моносахаридов;
3. Облегченная диффузия ингибируема — ингибирование может быть конкурентным, когда переносимые вещества конкурируют за одно и то же место на молекуле переносчика, тем самым, снижая потребление одного из них, и неконкурентным, когда определенные соединения ингибируют синтез молекул-переносчиков или изменяют их структуру, действуя на места, отличные от субстрат-связывающих участков.

Активный транспорт — перенос веществ против градиента химического (электрохимического) потенциала или перенос молекул из мест с меньшей концентрацией вещества в места с большей концентрацией вещества (рис. 3). Подобно облегченной диффузии активный транспорт — процесс, опосредованный переносчиками, и поэтому проявляет насыщаемость, специфичность и ингибируемость. Однако в отличие от облегченной диффузии активный транспорт требует использования метаболической энергии, обычно в форме АТФ, чтобы активно перекачивать молекулы через мембрану. Вследствие этого он дополнительно может ингибироваться

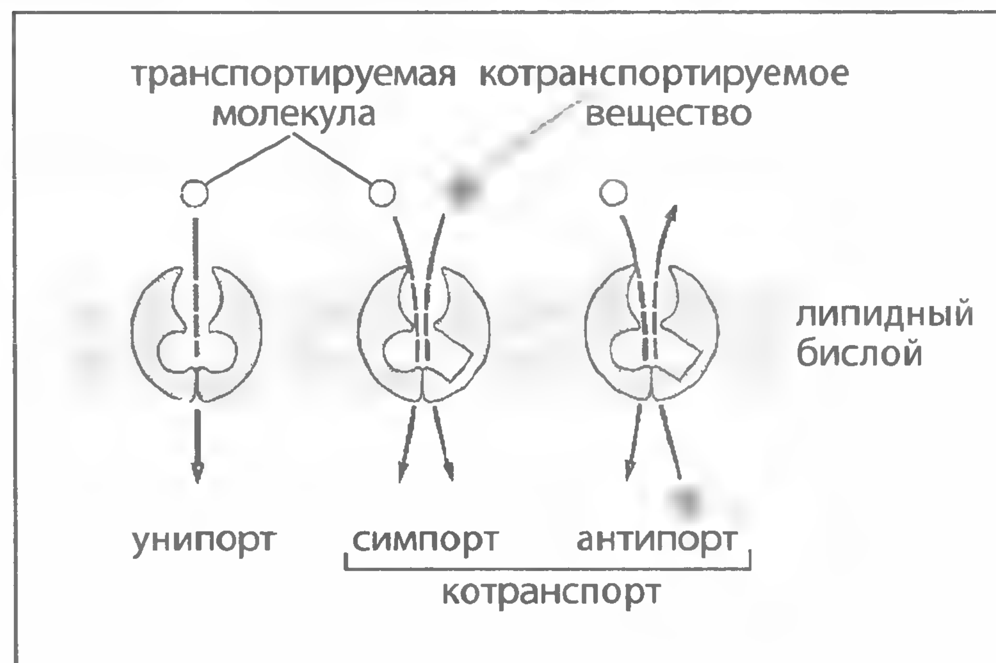


Рис. 4. Транспортные процессы. http://vmede.org/sait/content/Biohimija_severin_2011/7_files/mb4_005.jpeg

веществами или окружающими условиями, влияющими на продукцию энергии в клетке. Так, активный транспорт ингибируется анаэробными условиями, которые снижают клеточный уровень АТФ. Ингибитор гликолиза, фторид, также подавляет активный транспорт.

Первично-активный транспорт — транспорт веществ, сопряжённый с реакцией гидролиза АТФ, в ходе которой выделяется энергия, используемая для перемещения веществ через мембрану против градиента химического μ (электрохимического, $\widetilde{\mu}$) потенциала.

Примеры первично-активного транспорта через плазматическую мембрану:

- ✓ транспорт K^+ и Na^+;
- ✓ транспорт H^+;
- ✓ транспорт Ca^{2+}.

В плазматических мембранах имеется несколько разновидностей ионных насосов, работающих за счет свободной энергии гидролиза АТФ. Это специальные системы интегральных белков, так называемые транспортные АТФазы. Для плазматической мембраны грибов характерна протон-качающая АТФаза (H^+ АТФаза). Она составляет 5–10% белка плазматической мембраны у *N. crassa* и до 25% у *Candida albicans*. В гифах *N. crassa* 38–52% общей образованной АТФ потребляется этим ферментом. Фермент специфично гидролизует Mg-АТФ, при этом один протон выбрасывается из клетки на каждую продуцированную АДФ. Этот процесс электрогенный, создающий как мембранный потенциал, так и трансмембранный градиент pH. H^+–АТФазы плазматических мембран *N. crassa* и *S. cerevisiae* представляют собой одиночный полипептид с мол. массой примерно 100 кД и имеют 74% гомологии в последовательностях аминокислот. Фермент имеет 8 пересекающих мембрану доменов у *N. crassa* и 10 у *S. cerevisiae*. N- и С-концы фермента гидрофильны и находятся в цитоплазме. Только 4% белка экспонировано на внешней поверхности мембраны. Активность H^+ АТФаз регулируется глюкозным метаболизмом и подкислением цитоплазмы через фосфорилирование С-концевой части молекулы фермента.

Вторично-активный транспорт — транспорт веществ, использующий энергию не прямого гидролиза АТФ, а запасенную в ионных градиентах, создаваемых транспортными АТФазами. У грибов за счет протонного градиента, созданного H^+–АТФазой, транспортируются углеводы и аминокислоты, неорганические катионы и анионы.

К настоящему времени достаточно хорошо описаны следующие системы вторично-активного транспорта (рис. 4).

1. Однонаправленный перенос иона в комплексе со специфическим переносчиком по созданному градиенту получил название *унипорта*. Здесь может быть задействован еще один тип транспортного белка, ионные каналы, которые имеют более высокую скорость оборачиваемости (на 2–3 порядка) по сравнению с белками-переносчиками и помпами. Они действуют как ворота или регулируемые поры, позволяя специфическим ионам двигаться по их электрохимическим градиентам. Ионные каналы классифицируют (А) по типу пропускаемых ионов: натриевые, калиевые, кальциевые и хлорные каналы, и (Б) по способу регуляции: потенциал-чувствительные, хемочувствительные (рецептор-управляемые), регулируемые внутриклеточными веществами (ионами).
2. Совместный однонаправленный перенос веществ с участием двухместного переносчика называется *симпортом*. В этом случае одно вещество, диффундируя по градиенту своей концентрации (в случае плазматической мембраны грибов это H^+), как бы тянет с собой другое, следующее против электрохимического градиента.

3. Встречный перенос веществ с участием одноместной молекулы-переносчика получил название *антипорта*. То есть в этом случае молекулы одного вещества, следующие по созданному предварительно градиенту концентрации, как бы обмениваются на молекулы другого вещества. И если исходно разность концентраций второго вещества отсутствовала, то результатом переноса станет накопление этого вещества за счет уменьшения разности концентраций первого.

Механизмы транспорта сходны у мицелиальных грибов и дрожжей. Грибы способны не просто перемещать вещества из внешней среды в клетку, но и концентрировать их там. За это ответственны два типа систем потребления, опосредованных переносчиками или каналами. Конститутивный низкоаффинный переносчик позволяет облегчить диффузию вещества, находящегося вне клетки в высокой концентрации. При более низкой внешней концентрации дерепрессируется высокоаффинный транспортер. Присутствие двух транспортных систем для одного и того же вещества может быть энергетически выгодно для организма. Когда вещества много, оно может входить в клетки через низкоаффинную систему, не требующую расходования энергии. Когда внешняя концентрация вещества низкая, дерепрессия высокоаффинных транспортеров, использующих вторично-активный транспорт, позволяет продолжить накопление вещества в клетке. Низкоаффинная и высокоаффинная системы работают при транспорте K^+ у *S. cerevisiae,* сульфата, фосфата и сахаров у *N. crassa.* Во всех этих случаях высокоаффинная система работает через симпорт, сопряженный с H^+.

Литература

Гринштейн С.В., Кост О.А. 2001. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Успехи биологической химии. Т.41. С.77–104.

Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B. 2007. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. Minireview // Eukaryotic Cell. Vol.6. No.5. P.755–763.

Gaulin E., Bottin A., Dumas B. 2010. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens // Plant Signaling & Behavior. Vol.5. No.3. P.258–260.

Gooday G.W. 1994. [Cell membrane] // Neil A.R., Geoffrey M. (eds.). The growing fungus. London: Chapman and Hall. P.463–474.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. 2007. Molecular Cell Biology. 6th edition. Harvey Lodish Publisher: W. H. Freeman. 973 p.

Moore D., Robson G.D., Trinci A.P.J. 2011. 21st Century Guidebook to Fungi. UK: Cambridge University Press.1454 p.

van der Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. 1995. The Plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis // Microbiological Reviews. Vol.59. No.2. P.304–322.

Robson G.D. 1999. [Hyphal cell biology] // R.P. Oliver, M. Schweizer (eds.). Molecular Fungal Biology. UK: Cambridge University Press. P.164–184.

Singer S.J., Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // Science. Vol.175. P.720–731.

Turk M., Mejanelle L., Šentjire M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenita A. 2004. Saltinduced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeastlike melanized fungi // Extremophiles. Vol.8. P.53–61.

Turk M., Abramovic Z., Plemenita A., Gunde-Cimerman N. 2007. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi // FEMS Yeast Res. Vol.7. P.550–557.

Weete J.D., Abril M., Blackwell M. 2010. Phylogenetic distribution of fungal sterols // PLoS ONE. Vol.5. No.5: e10899.

Глава 2.

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА ГРИБОВ[1]

2.1. Введение. Общая характеристика клеточной стенки

Клеточная стенка грибов представляет собой сложную внеклеточную структуру, окружающую клетки. Стенка грибной клетки имеет уникальные черты организации, и ее состав является важным филогенетическим и таксономическим признаком представителей царства грибов. Она определяет жизненную форму грибов (мицелиальную или дрожжеподобную) и осуществляет связь грибной клетки с внешним миром.

Стенка грибов — тонко организованный сложный комплекс разнообразных полисахаридов, белков, липидов, пигментов и минеральных солей. Молекулярный состав и организация полимеров клеточной стенки могут быть различными у представителей разных таксонов, на разных стадиях жизненного цикла, при различных условиях культивирования. Клеточная стенка — динамичный компартмент, который изменяется в течение жизни грибов.

В этой главе будут рассмотрены фундаментальные аспекты структуры и архитектуры, функции клеточной стенки грибов, будут детально охарактеризованы ее главные компоненты: хитин, глюкан, маннан и гликопротеины, описаны клеточный синтез и реконструкция, рассмотрены вопросы структуры и состава чехла у мицелиальных грибов и дрожжей.

2.2. Функции клеточной стенки

Можно выделить несколько основных функций:

✓ **Клеточная стенка как пограничная органелла осуществляет взаимодействие с окружением и защиту от внешней среды обитания**. Клеточная стенка обеспечивает взаимодействие с внешней средой, что особенно важно для грибов, питающихся осмотрофно. Кроме того, при участии компонентов клеточной стенки осуществля-

---

[1] Сокращения

ГДФ — гуанозиндифосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
КС — клеточная стенка
СЭМ — сканирующая электронная микроскопия
УДФN-ацетилглюкозамин — уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин
УДФ-глюкоза — уридиндифосфат- глюкоза
ХС/Chs — хитинсинтаза
ЭР — эндоплазматический ретикулум
CWI (cell wall integrity) — путь поддержания целостности клеточной стенки
G-белки — белки, связывающие гуанозиновые нуклеотиды
GPI-белки (GPI-якорь) — белки, связанные на С-конце с гликозилфосфатидил-инозитолом
MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы
Pir-белки — белки с внутренними повторами
R-глюкан — щелоченерастворимый глюкан
S-глюкан — щелочерастворимый глюкан

ется коммуникация грибных клеток и узнавание хозяина в случае патогенных видов. Клеточная стенка первая подвергается опасности действия окружающих факторов или ингибиторов, которые образует хозяин, благодаря наличию рецепторов она осуществляет передачу сигналов в клетку и реагирует синтезом необходимых для нормального функционирования метаболитов. Обладает избирательной проницаемостью для питательных субстратов. В зависимости от условий окружающей среды полисахаридный состав, структура и толщина стенки сильно варьируют и скоординированы с клеточным циклом и циклом развития гриба.

✓ **Морфогенетическая роль в определении формы роста клеток грибов**. Благодаря разному составу и способу отложения материала клеточных стенок, образуются мицелиальные или дрожжевые клетки. Клеточная стенка должна оставаться пластичной для обеспечения роста, деления клеток и формирования разных типов клеток (вегетативный мицелий, споры, плодовые тела, склероции и т.д.) в процессе цикла развития. Ее разрушение приводит к нарушению роста и морфологии клеток грибов и увеличивает вероятность быстрой гибели клеток. Клеточная стенка является мишенью для антигрибных препаратов.

✓ **Стабилизирует внутреннее осмотическое давление,** что очень важно для сохранения формы клетки. Внутри клеток грибов создается давление равное 2,5 атмосфер. Высокое внутриклеточное давление необходимо для всасывания питательных веществ и продвижения в плотном субстрате.

✓ **Защищает против физического и химического стрессов**, **функционирует как защитный покров.** Комбинирование механической прочности и высокой эластичности за счет присутствия полисахаридов позволяет стенке перераспределять физический стресс и передавать данные о нем, обеспечивает эффективную защиту от механического и ферментативного разрушения и позволяет гифе проникнуть и расти внутри агрессивного субстрата;

✓ **Клеточная стенка служит каркасом для белков**. Основными компонентами клеточной стенки являются полисахаиды и белки (например, *гликопротеины*, *гидрофобины*, ферменты и др.). Полисахариды обеспечивают механическую прочность стенки и выполняют функцию опоры для белков, прикрепленных к ним. Белки выполняют множество очень важных функций. Гликопротеины ограничивают проницаемость стенки (в обоих направлениях), создают микроокружение во внутренних слоях стенки смежных с мембраной, участвуют в узнавании: субстрата, партнеров при спаривании, хозяев для патогенных грибов, в последующей адгезии и захвате субстрата. Гидрофобины предохраняют от высыхания и осуществляют адгезию мицелия к субстратам.

2.3. Строение клеточных покровов у грибов

Исследование грибных клеточных стенок под электронным микроскопом показало наличие нескольких слоев с разной электронной плотностью (рис. 5). Количество и выраженность слоев определяется многими факторами: видом гриба, жизненной формой вегетативного тела или типом таллома (одноклеточные или мицелиальные грибы); стадией жизненного цикла (репродуктивные или вегетативные структуры); положением клеток в колонии (апикальные или субапикальные клетки мицелия); условием культивирования (глубинное или поверхностное); способом подготовки образца для микроскопирования и методом исследования.

Клеточные стенки мицелия исследованных аскомицетных и базидиомицетных грибов в большинстве двухслойные, реже однослойные и многослойные. Апикальные клетки гифы у мицелиальных грибов имеют тонкие однослойные клеточные стенки и являются местом активной сборки компонентов стенки (см. подробно далее), а в удаленных от апекса клетках мицелия клеточные стенки многослойные и имеют большую толщину.

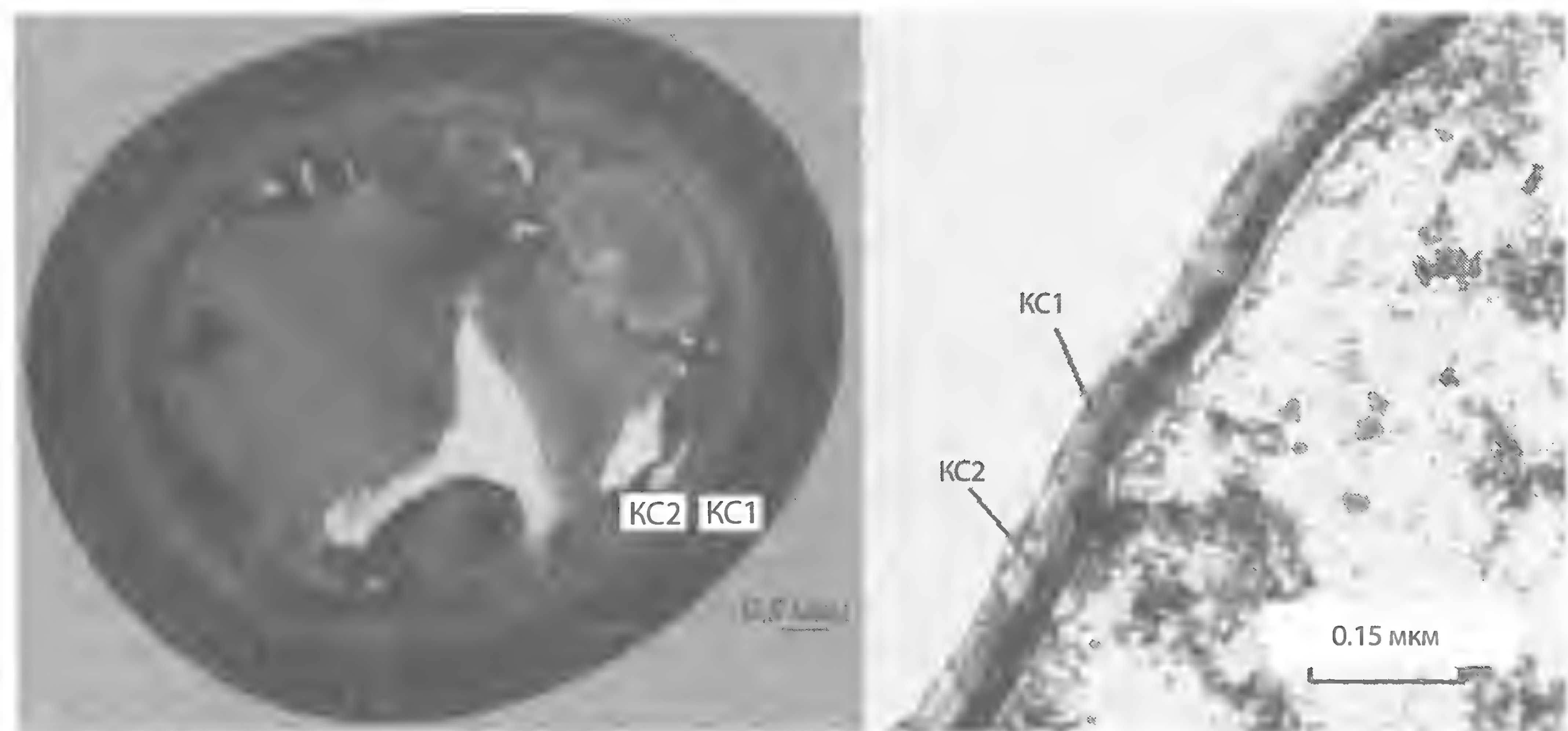


Рис. 5. Спора (а) и фрагмент мицелия (б) *Agaricus bisporus* U3.Обозначения: КС1 и КС2 — слои клеточной стенки.

Споры грибов имеют, как правило, более толстые многослойные клеточные покровы, чем мицелий. Так, например, споры шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* имеют два и более слоев с толщиной в среднем в три раза большей, чем у мицелия (рис. 5а, б). Наружный слой клеточных стенок спор пигментированный, а внутренний — нет, в то время как у мицелия наружный слой клеточной стенки электронно-прозрачный, а внутренний — электронно-плотный при аналогичном способе подготовки образцов

Строение клеточных стенок у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae* и дрожжевой стадии *Candida albicans* сходно. Клеточные покровы рассматриваемых трех видов дрожжей трехслойны. На примере клеток патогенных дрожжей *C. albicans* можно видеть детали строения наружного слоя клеточной стенки , образующего фимбрии (рис. 6).

У дрожжей патогенов человека базидиального аффинитета *Cryptococcus neoformans* клеточные покровы трехслойны и состоят из внутреннего темноокрашенного меланин-содержа-

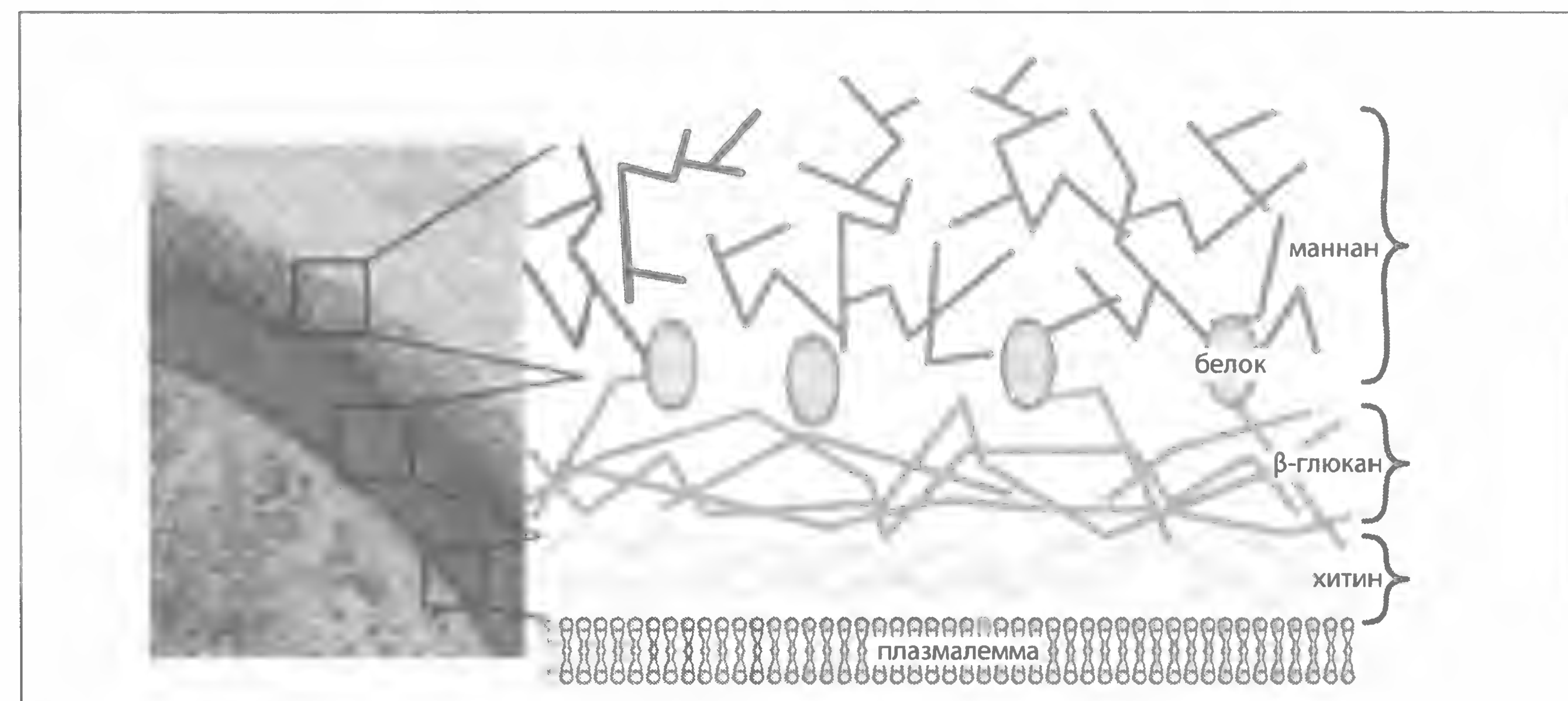


Рис. 6. Структура клеточной стенки дрожжевой клетки *Candida albicans* (Hardison, Brown, 2012)

щего слоя клеточной стенки, наружного неокрашенного слоя и капсулярного внеклеточного материала, который определяет вирулентность *C. neoformans* (рис. 7). Частицы меланина во внутреннем слое стенки упакованы в несколько слоев, что создает серьезное препятствие для проникновения крупных молекул (например, лекарственных препаратов) внутрь клетки гриба.

2.4. Структура и состав клеточной стенки грибов

По химическому составу клеточные стенки грибов состоят из полисахаридов, белков, липидов, пигментов и неорганических солей. Полисахариды составляют до 80% от сухого веса клеточных стенок. Белки — до 20%, еще меньше липидов и других минорных компонентов, таких как пигменты и неорганические соли (1–2%). Все компоненты клеточной стенки грибов образуют единую структуру благодаря разным типам связей между молекулами (ковалентным и нековалентным, главным образом, гидрофобным и водородным).

В большинстве случаев бывает трудно связать химический состав клеточной стенки с числом наблюдаемых слоев из-за возможных артефактов при приготовлении клеток, типов наблюдаемых клеток (дрожжи или мицелий), фазы клеточного цикла и метода фиксации (перманганат калия или осмий). Кроме того, состав клеточной стенки постоянно варьирует.

Несмотря на вариации в строении клеточных стенок у разных видов аско- и базидиомицетных грибов, которые составляют большинство грибов на Земле, выделяют два основных структурных компонента стенки *скелетный* и *матриксный,* имеющих разную функциональную нагрузку. На рис. 8 показана обобщенная модель структуры клеточной стенки мицелиальных грибов и дрожжей. Скелетный компонент у большинства исследованных грибов представлен определенными полисахаридами, как-то: хитином, нецеллюлозным глюканом, в редких случаях целлюлозой. Матриксный компонент связан химическими связями со скелетными полисахаридами и может состоять из нецеллюлозных глюканов различных типов, маннанов, хитозана, галактанов, полимеров галактозамина и белков. По результатам биохимических и молекулярных исследований внутренний слой клеточной стенки грибов, видимый под электронным микроскопом (скелетный компонент), представлен хитином и глюканом (кроме зигомицетов, которые содержат хитин и хитозан), а наружный слой, составляющий матриксный компонент - гликопротеинами и глюканами у мицелиальных грибов (рис. 8А) или гликопротеинами и маннанами у дрожжей (рис. 8Б). Все компоненты клеточной стенки и составляющие их химические вещества (хитин, глюканы и гликопротеины) в значительной степени связаны между собой, образуя трехмерную сеть, которая составляет структурную основу клеточной стенки. Гликопротеины связаны с глюканами клеточной стенки через водородные связи или ковалентно. Помимо основных компонентов может присутствовать также капсулярный материал или чехол (рис. 7А).

В дополнение к сказанному стоит упомянуть, что у мицелиальных грибов различают латеральные (боковые) клеточные стенки и септы (типы и способ образования см. главу 4). Причем в состав латеральных клеточных стенок мицелиальных грибов входят скелетные полисахариды (составляют основу внутреннего слоя, видимого под микроскопом) и белки (составляют наружный слой) (рис. 8). Септы образованы только скелетным компонентом.

Клетки дрожжей окружены трехслойными клеточными стенками, включающими скелетный компонент (хитин и/или нерастворимый в щелочи глюкан) и матриксный компонент (растворимый в щелочи глюкан и гликопротеины). Так, например, клеточные стенки *S. cerevisiae* состоят в основном из хитина (1–2% от сухого веса клеточной стенки), β-глюкана (50–60%) и маннопротеина (25–40%), а *S. pombe* — из β-глюкана (50–54%), α-глюкана (28–32%) и галактоманнана (9–14%). Клеточные стенки дрожжевых клеток *C. albicans* содержат хитин (0,6–9%), β-глюканы (47–60%) и маннопротеины (40%), тогда как мицелий *C. albicans* имеет в три раза больше хитина и меньше маннопротеинов, что обусловливает жесткую структуру гифы.

Основные сведения о грибной клеточной стенке исходят из детального молекулярного, геномного и протеомного анализа модельных грибных организмов, важнейшие среди которых *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* и *Neurospora crassa*, принадлежащие к группе Ascomycota.

Таким образом, сделанная на основании имеющихся данных молекулярная модель структуры грибной клеточной стенки представляет собой трехмерную сеть полисахаридов и белков, многие из которых уникальны для грибов (рис. 8). Основу клеточных стенок грибов составляют скелетные щелоченерастворимые полисахариды — высоко эластичные и прочные (хитин и некоторые глюканы), связанные с разнообразными щелочерастворимыми полисахаридами и белками.

2.4.1. Углеводы, участвующие в построении клеточной стенки грибов

Полисахариды формируют главный структурный остов клеточной стенки.

2.4.1.1. Хитин

Хитин — основной скелетный компонент клеточной стенки большинства грибов, представляет собой линейный полимер аминосахара β-(1→4) -N-ацетил-D-глюкозамина (рис. 9). Отдельные цепочки полимера соединяются между собой водородными связями в микрофибриллы. Хитин более инертное вещество, чем целлюлоза (рис. 9), он нерастворим даже в смесях щелочей и кислот.

В клеточной стенке *Neurospora* и *Aspergillus* хитин составляет 10–20%, у бластокладиомицета *Allomyces* — 60%. Хитин может быть и минорным компонентом, выполняя при этом скелетные функции. Так, у дрожжей хитин составляет всего 1–2% от сухого веса клеточной стенки

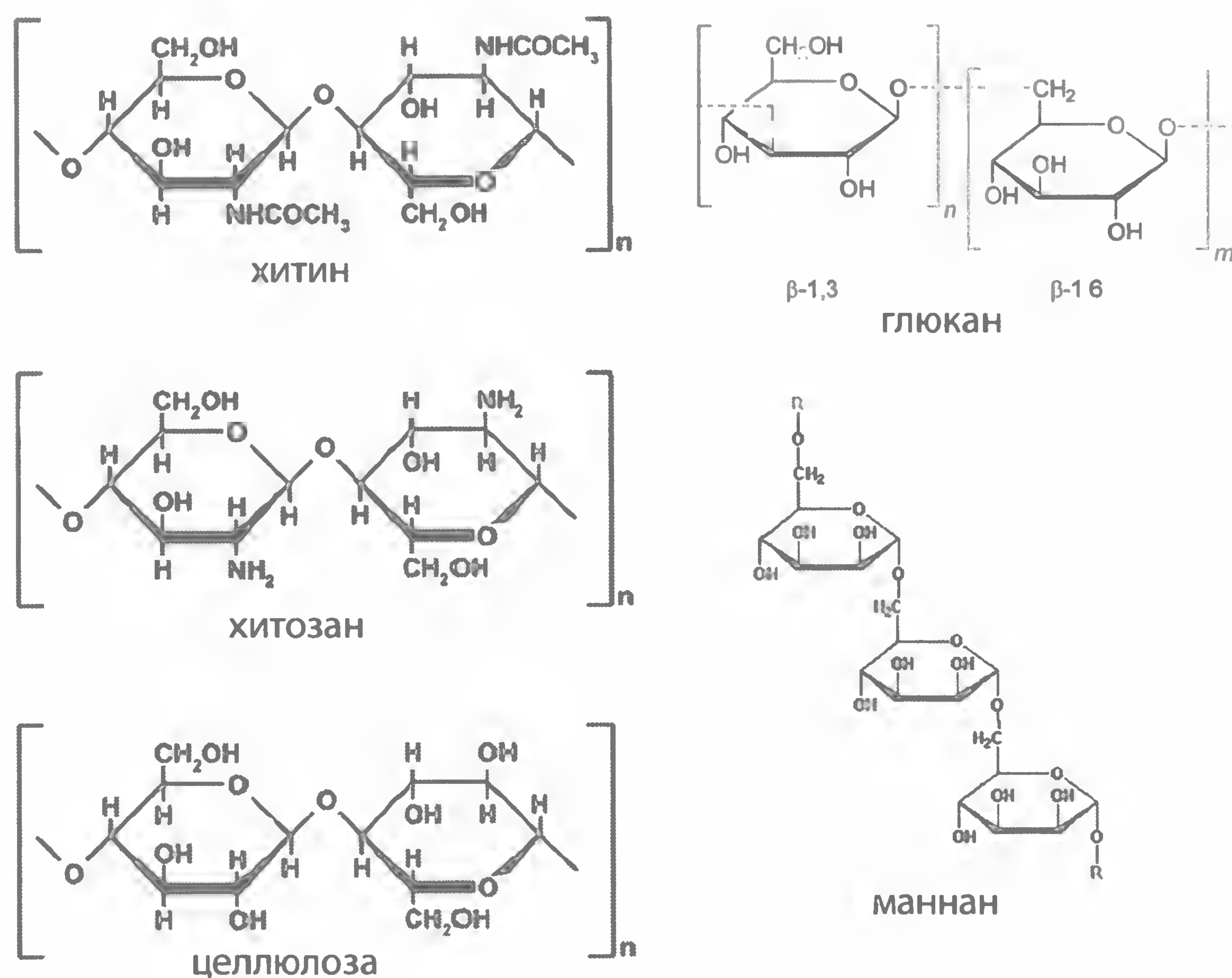


Рис. 9. Полисахариды клеточной стенки грибов.
Хитин с β-1,4-связями, хитозан с β-1,4-связями, целлюлоза (β-1,4,-глюкан), глюкан с β -1,3- и β -1,6-связями, маннан с β-1,6-связями.

Но, при этом, примерно 90% всего хитина сконцентрировано, главным образом, в районе септы, отделяющей материнскую клетку от дочерней, где он образует жесткое кольцо, защищающее канал между ними. В латеральной клеточной стенке локализовано только 10% этого компонента. Таким образом, хитин является важным в некоторых точках/участках дрожжевой клеточной стенки, хотя главный структурный компонент у этих одноклеточных грибов — β-глюкан.

Хитин, имеющий очень высокое сопротивление разрыву, вносит значительный вклад в прочность клеточной стенки. При нарушении синтеза хитина материал клеточной стенки неупорядочен, клетки уродливые и осмотически нестабильны. При этом хитин не встречается изолировано, его взаимодействия с другими компонентами очень важны для организации клеточной стенки. В частности, ковалентные перекрестные связи формируются между хитином и глюканами.

2.4.1.2. Хитозан

Хитозан является основным *скелетным* компонентом клеточной стенки Zygomycota и образуется из хитина при участии фермента хитин-деацетилазы. Хитозан встречается также и у других групп грибов, например, у некоторых базидиомицетов (*Filobasidiella neophormans*, *Pleurotus sajor-caju*), аскомицетов (*Aspergillus niger*, *Humicola lutea*, *Fusarium moniliforme*) как минорный компонент стенок мицелия, и в клеточных стенках аскоспор пивных дрожжей. Хитозан – необычный природный полимер, так как он является поликатионом с сильными адсорбционными свойствами. В клеточных стенках зигомицетов он часто связан с анионными полимерами, богатыми глюкуроновой кислотой и полифосфатами.

2.4.1.3. Глюканы

Глюканы могут входить в состав *скелетного* или *матриксного* компонента, а могут выполнять две функции одновременно. Глюканы грибов — это общий термин для разнообразных полисахаридов, представляющих собой полимеры D-глюкозы и различающихся по типу и содержанию гликозидных связей (рис. 9).

Хотя хитин играет важнейшую роль в обеспечении прочности клеточной стенки, глюкан является также очень важным структурным полисахаридом грибной клеточной стенки и составляет до 50–60% ее сухого веса. В основном (65–90%) — это β-1,3-глюкан, но у разных грибов обнаружены также β-1,6-глюкан, смесь β-1,3 – β-1,4-глюканов, α-1,3- и α-1,4-связанные глюканы. β-1,3-глюкан служит главным структурным компонентом, к которому другие компоненты присоединены ковалентными связями. Поэтому для формирования полноценной клеточной стенки необходим синтез, прежде всего, β-1,3-глюкана.

2.4.1.4. Маннаны

Полимеры маннозы представлены в той или иной степени в клеточных стенках всех видов грибов и составляют матриксный компонент клеточных стенок (рис. 9). Они находятся в форме гликопротеинов, которые при этом некоторые авторы также называют маннанами. Серологически они близки к маннанам млекопитающих и отличаются от маннанов растений, состоящих исключительно из маннозы. Пептидоманнаны преобладают в наружном слое клеточных стенок сахаромицетов, придавая клеточным стенкам пластичность и мягкость. У *A. fumigatus* и *S. pombe* маннан, точнее маннан, связанный с галактозой (галактоманнан), является важнейшим компонентом клеточной стенки и связан ковалентно с другими полисахаридами (глюканами).

У грибов присутствует два типа молекул маннана, связанных с белками клеточной стенки: короткоцепочечные, состоящие из 5 или 6 остатков маннозы, связанных через α-1,3- и α-1,2-связи с остатком серина или треонина белка. Другой тип — высокомолекулярый ветвящийся маннан, состоящий из десятка или даже сотни маннозильных единиц, в зависимости от гликопротеина и вида гриба, связанных α-1,2-, α-1,3- и α-1,6-связями. Некоторые из маннозных остатков фосфорилированны. Показано, что остатки фосфоманнана в клеточной стенке грибов отвечают за связь с осмотином (защитный белок растений, токсичный для широкого круга грибов).

2.4.2. Белки

К настоящему времени продемонстрировано присутствие белкового компонента во всех слоях клеточных покровов грибов. Белки *S. cerevisiae* и *C. albicans* могут составлять от 30 до 50% сухой массы клеточной стенки. У мицелиальных грибов — 20–30%. Электронно-микроскопическое исследование свидетельствует о том, что белки неравномерно распределены в клеточной стенке и около ее поверхности.

В клеточной стенке грибов присутствуют структурные и каталитические белки, которые принимают участие в выполнении ряда функций клеточной стенки на определенных стадиях жизненного цикла грибов и в определенных условиях окружающей среды. Структурные белки прочно связаны с клеточной стенкой, а каталитические — связаны слабо и даже секретируются в среду. Белки принимают непосредственное участие в росте и морфогенезе, прикреплении к субстрату, спаривании и формировании биопленки, у патогенов они выполняют роль факторов вирулентности и иммуногенов. Некоторые из этих функций белков зависят от укладки полипептида, другие зависят от степени гликозилирования. Например, белки, локализованные снаружи клеточной стенки, отвечают за свойство проницаемости клетки, большая проницаемость соответствует меньшей гликозилированности.

У грибов описано множество каталитических и структурных белков клеточных стенок. Неполный список таких белков включает: Pir белки (белки с внутренними повторами), гликозил-фосфатидилинозитольные белки (GPI белки), Cwp1, Bgl2, хитиназы, Bar 1 (протеаза), агглютинины, гликозидазы и потенциальные глюканазы, активные в метаболизме стенки, процессах роста и морфогенеза, адгезины, такие как Hwp1, Ala1p/Als5p, Als1p из *C. albicans* и Epa1p из *C. glabrata*, флокулины такие как Flo1, ответственный за агрегацию клеток дрожжей, и белки, ответственные у дрожжей за проницаемость для железа (FIT1, FIT2, FIT3). Все эти белки известны главным образом на примере модельных дрожжей *S. cerevisiae* и *C. albicans*.

Типы белков:

Большинство стеночных белков по своей природе гликопротеины, хотя есть и негликозилированные белки, такие как гликолитические ферменты, Hsp40, гидрофобины и др. У грибов обнаружено 3 типа гликозилирования белков:

1. О-Гликозилирование предполагает наличие О-гликозидной связи между остатком сахара и гидроксильной группой серина или треонина белка. Эта связь расщепляется при действии слабой щелочи (β-элиминирование). У дрожжей О-связанные углеводные цепочки содержат обычно 4–5 маннозильных остатков, соединенных α-1,3- и α-1,2-связями. Количество таких О-связанных маннозильных цепей на одну молекулу белка может быть достаточно велико. О-Связанные олигосахариды локализуются в Ser/Tre-богатых областях белков, возможно, имеющих жесткую вытянутую конформацию.
2. N-Гликозилирование предполагает связывание разветвленных полисахаридных цепей с белком через хитобиозный мостик при помощи N-гликозидной связи между N-ацетил-D-глюкозамином и β-амидным азотом аспарагина в белке. N-Гликозидная связь стабильна в щелочи, но может расщепляться специфическими ферментами Endo H- и Endo F-гликозидазами. Такой тип гликозилирования идет по остатку аспарагина, входящему в один из двух трипептидов в составе белка Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X — любая аминокислота, кроме Pro. Следует отметить, что у дрожжей используются для гликозилирования не более трети таких потенциальных сайтов. Присоединяемые высокоразветвленные полисахаридные цепи неоднородны по строению и состоят из внутренней части — кора, включающей 12–15 маннозных остатков, и вариабельной по размеру внешней части.
3. Белки, содержащие на С-конце гликозил-фосфоинозитольный якорь (GPI якорь), который присоединяется к белку через фосфоэтаноламин. Такие белки имеют С-концевой фрагмент, состоящий из остатка глицина или аспарагина, полярного домена (5–10 аминокислот) и гидрофобного домена (15–20 аминокислот).

Белки клеточной стенки могут быть классифицированы согласно разным критериям, включая молекулярную структуру, функции или способ связывания с компонентами стенки. Так, белки клеточной стенки дрожжей делят на три группы, исходя из способа их экстракции. К первой группе относят белки, экстрагируемые при нагревании детергентами и тиоловыми реагентами, ко второй — белки, выделяемые из клеточных стенок под действием глюканаз после удаления белков первой группы, и к третьей — белки, выделяемые из клеточных стенок под действием щелочи после удаления белков первой группы. Такое деление отражает способ закрепления белковых молекул в клеточной стенке и отчасти позволяет сгруппировать их по характеру функций.

Анализ экстрагированных белков показал, что в первую группу попадают не структурные белки, а в большинстве своем ферменты, закрепленные в клеточной стенке нековалентными или дисульфидными связями. Среди ферментов значительное число гидролаз, ответственных за начальные стадии расщепления пищевых субстратов. До сих пор нет четкого представления о том, как эти ферменты встроены в клеточную стенку и как в большинстве случаев осуществляется их регуляция.

Во-второй и третьей группах находятся белки, ковалентно связанные с элементами полисахаридного каркаса клеточной стенки дрожжей. Белки второй группы связаны с β-1,6-глюканом клеточной стенки через фосфоэтаноламин-маннозный мостик GPI якоря. Наиболее изученным белком этой группы является α-агглютинин. Белки третьей группы — это белки с внутренними повторами (Pir-белки), характеризующиеся высокой степенью О-маннозилирования и отсутствием GPI якоря на С-конце. Их соединение с полисахаридным каркасом осуществляется через О-связанные маннозные цепи.Роль белков в качестве структурных элементов клеточной стенки реализуется в двух направлениях. 1. Белок может скреплять отдельные молекулы полисахаридов, с которыми он связан ковалентными связями в единую структуру. Он может служить местом закрепления других белков клеточной стенки, соединенных с ним дисульфидными или другими типами связей. 2. Роль белка определяется его ферментативной активностью. При этом важную структурную роль играют ферменты, осуществляющие включение вновь синтезированных элементов в клеточную стенку.

В целом же, белки клеточных стенок вносят существенный вклад в адгезию клеток грибов, защиту против внешнего стресса, абсорбцию молекул, передачу внутриклеточных сигналов и восприятие внешних стимулов, а также синтез и ремоделирование компонентов стенки.

Рассмотрим некоторые примеры подобных белков.

Адгезины (сюда же относятся белки, участвующие в процессе спаривания - агглютинины) представляют собой пополняющийся постоянно класс белков клеточной адгезии, которые важны для широкого круга взаимоотношений грибной клетки с внешней/окружающей средой. Это гликопротеины, которые секретируются в клеточную стенку, закрепляются с помощью GPI якоря в цитоплазматической мембране и функционируют в поверхностном слое клеточной стенки.

Адгезины участвуют в узнавании клеток при спаривании (у почкующихся дрожжей), а также в дифференциации плодовых тел, например, галектины базидиомицета *Coprinopsis cinerea.*

Адгезины осуществляют также сцепление с поверхностями других клеток. Их фибриллы распространяются на некоторое расстояние от клеточной стенки и могут быть обнаружены там, где грибы прикасаются к поверхностям. Например, при узнавании и общении патогенных грибов с клетками растений или животных, а также организмов-мутуалистов (лишайники) адгезины способствуют сцеплению с поверхностью клеток хозяев. Адгезины принимают участие при формировании биопленок как на природных, так и на технических поверхностях.

Патогенный для животных и человека гриб *Blastomyces dermatitidis* растет как мицелиальная плесень в почве, загрязненной экскрементами животных; его споры при попадании в легкие человека превращаются в агрессивные дрожжи и вызывают потенциально смертельный бластомикоз. Адгезин этого гриба имеет доменную структуру наподобие эпидер-

мального фактора роста животных и, связываясь с клетками хозяев, подавляет иммунный ответ хозяина, способствуя развитию инфекции.

Поверхность большинства гиф в воздушной среде сухая и гидрофобная (несмачиваемая водой). Примерами гидрофобных поверхностей могут служить многочисленные грибные споры, распространяемые по воздуху, спорофоры, а также все типы воздушного мицелия и воздушных структур наподобие плодовых тел и стром. Наружная поверхность стенок гиф воздушного мицелия и спор в этом случае обычно состоит из слоя палочковидных белков из семейства гидрофобинов шириной 10 нм, которые модифицируют биофизические свойства поверхности стенки. Гидрофобины принадлежат к большой и разнообразной группе родственных белков, широко представленных у грибов; при максимальной экспрессии они могут достигать 10% от общего белка стенки. Каждая молекула гидрофобина состоит из гидрофобного и гидрофильного доменов; поэтому они относятся к *амфипатическим* веществам (к ним же относятся фосфолипиды, составляющие мембраны клеток). Их N-концевая часть определяет гидрофильную сторону комплекса. Амфипатическая структура гидрофобинов обеспечивает молекулы удивительным набором функций:

- ✓ способность гиф преодолевать поверхностное натяжение на границе раздела воздух-вода во влажных местах обитания;
- ✓ обеспечение гидрофобности, необходимой гифе и спорам в контакте с воздухом для защиты от излишнего испарения воды; механизм защитного действия гидрофобинов основан на свойстве самосборки на границе раздела гидрофобной/гидрофильной поверхности в амфипатическую мембрану
- ✓ участие в формировании репродуктивных структур (спор полового и бесполого размножения);
- ✓ важная роль в формировании ткани плодового тела, особенно в контроле проницаемости для жидкости и воздуха;
- ✓ адгезия между гидрофобными клеточными стенками гриба и гидрофобными поверхностями растений и животных, что способствует внедрению в ткани хозяина и развитию инфекции;
- ✓ воздушные конидии *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium,* которые имеют поверхностный слой гидрофобинов, не активируют иммунную систему; поэтому в медицине споры и гифы, покрытые слоем гидрофобинов, называют 'иммунологически молчащей распространяющейся по воздуху плесенью'. Это означает, что хотя грибные споры повсеместны в воздухе, которым мы дышим, они не активируют иммунитет и не индуцируют воспалительный процесс после вдыхания;
- ✓ опосредование симбиотических взаимоотношений с корнями растений (микориза) и водорослями (лишайники).

Молекулы гидрофобинов – относительно маленькие белки размером 7–9 kDa. Они содержат порядка 100 аминокислот, для них характерно присутствие сигнальной последовательности для секреции и восьми цистеиновых остатков. Эти восемь постоянных цистеиновых остатков образуют четыре дисульфидных мостика и обеспечивают правильную сборку гидрофобина. Гидрофобины не гликозилированы. Они уникальны для мицелиальных грибов, экспрессируются у представителей аскомицетов и базидиомицетов. Имеются также доказательства присутствия гидрофобинов у зигомицетов и хитридиомицетов. Каждый гриб имеет несколько генов (часто более 10), контролирующих синтез разных гидрофобинов, и эти гены обычно экспрессируются в разное время. У *Schizophyllum commune* гидрофобин в клеточной стенке вегетативной гифы отличается от гидрофобина, который экспрессируется в стенке гифы плодового тела.

Гидрофобины секретируются из кончика гифы; если гифа находится в водном окружении, гидрофобины выделяются в раствор (рис. 10). На границе вода/воздух молекулы белка способны к самосборке. Каждая молекула гидрофобина связана с грибной стенкой гидрофильным концом; гидрофобный домен обращен наружу. По разнице в растворимости и

морфологии гидрофобины делят на две группы: гидрофобины класса I формируют трудно растворимые мембраны, которые расщепляются только трифторуксусной и муравьиной кислотами, в то время как гидрофобины класса II легко растворимы в этаноле или додецилсульфате натрия. По морфологии изолированные палочковидные частицы гидрофобинов напоминают *амилоидные фибриллы*, выделенные из тканей людей, умерших от болезни Альцгеймера, или образованные *in vitro*. Гидрофобины класса II значительно менее твердые, чем гидрофобины класса I , и не имеют палочковидной морфологии.

Гидрофобиновое покрытие гифы снижает перемещение воды через стенку, защищает от высыхания. Присутствие гидрофобной поверхности способствует связыванию с другой гидрофобной поверхностью. Это происходит из-за того, что гидрофобины не поляризованы и низшим энергетическим состоянием для двух гидрофобинов является связывание вместе, чтобы исключить электрическую поляризацию молекул воды. Покрытие стенок гиф гидрофобинами способствует использованию гидрофобного взаимодействия для связи воздушных гиф в тяжах, примордиях, плодовых телах. Покрытые гидрофобинами споры могут также прикрепиться к гидрофобной поверхности хозяев — растения или насекомого, обеспечивая возможность для формирования аппрессория или других проникающих структур.

У тканей грибов, которые входят в состав таллома лишайников, гидрофобины обеспечивают контроль перемещения газов и воды с растворенными питательными вещес-

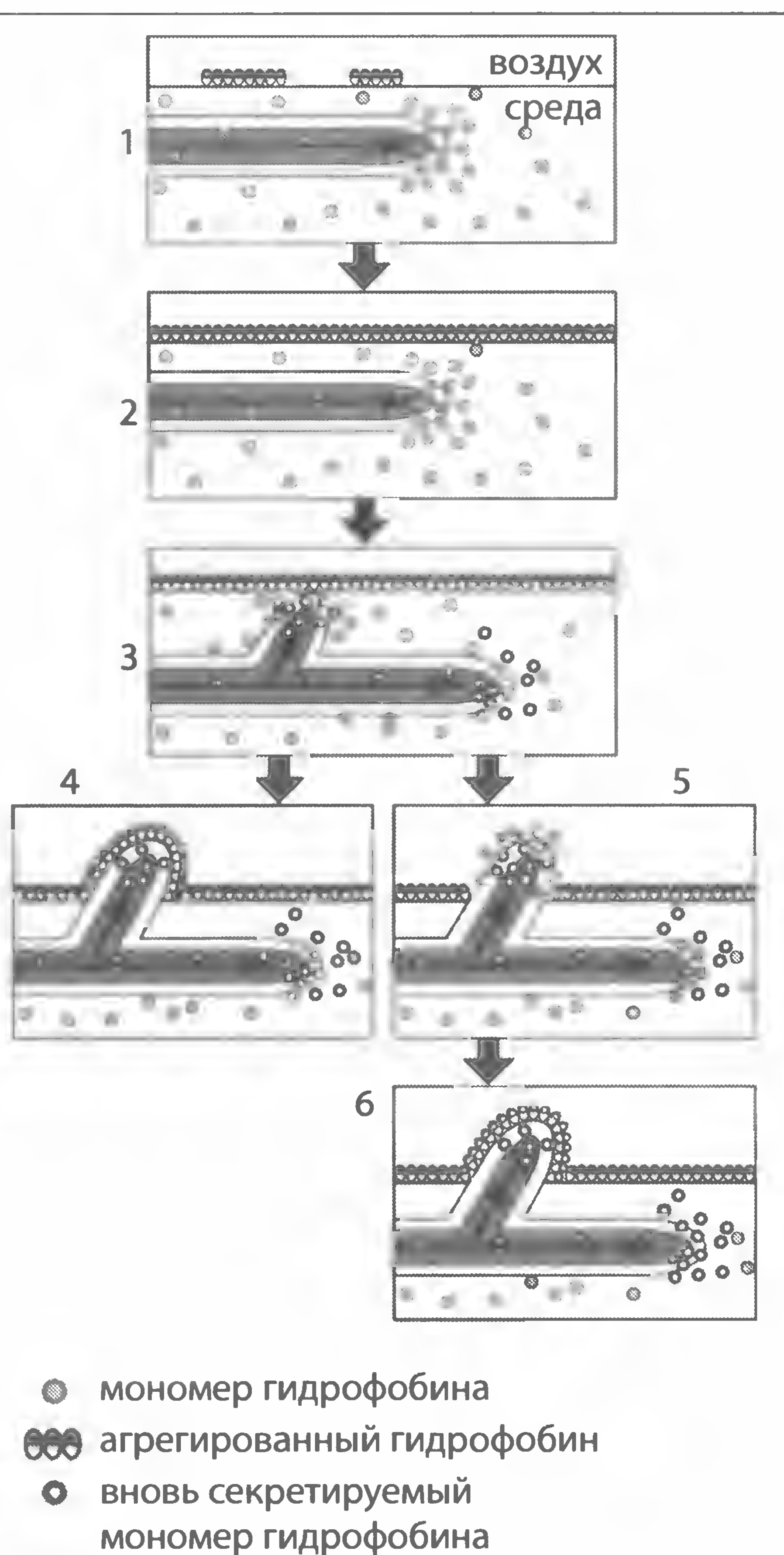


Рис. 10. Модель формирования грибных воздушных структур.
Мономеры гидрофобина секретируются гифой (1), самособираются в среде на границе раздела вода-воздух в амфипатичную мембрану (2) Под действием тургорного давления приближающаяся к границе раздела вода-воздух гифа может растягивать гидрофобиновую пленку, обеспечивая включение вновь секретируемых гидрофобиновых мономеров в мембрану (4). В этом случае гифа никогда не покидает водную среду обитания. Альтенативный вариант — гидрофобиновая мембрана прокалывается гифой и клеточная стенка контактирует с воздушной средой. Гидрофобиновые мономеры, секретируемые такой гифой, будут самособираться на поверхности раздела клеточная стенка - воздух (5). Гидрофильная сторона амфипатичной пленки контактирует с гидрофильной клеточной стенкой, в то время как гидрофобная сторона пленки подвергается действию воздуха. Гидрофобиновые пленки покрывающие гифу и водное пространство в дальнейшем могут сливаться (6) (Wősten, 2001).

твами. Замечательная способность гидрофобинов изменять природу поверхности (переключать гидрофобную поверхность на гидрофильную, и наоборот) делает гидрофобины интересными кандидатами для использования в коммерческих и медицинских целях.

Специального упоминания заслуживает очень любопытный гликопротеин грибов - гломалин, который в изобилии образуется в клеточных стенках гиф и спор грибов, формирующих арбускулярную микоризу, и накапливается в почве.

Этот белок интересен масштабом, с которым он образуется. Он пропитывает почвенную органику, причем содержание углерода в нем может достигать до 30% от всего углерода в почве. В почве гломалин формирует скопления почвенных гранул, которые создают особую структуру почвы. Гломалин синтезируется только членами отдела Glomeromycota, например, видами рода *Glomus*, которые образуют арбускулярную микоризу.

2.4.3. Внеклеточный чехол (капсула) или внеклеточный слизистый материал

Чехол образуют грибы из разных таксономических и экологических групп, мицелиальные грибы и дрожжи. Описано множество морфологических форм внеклеточного материала, называемых внеклеточный матрикс, слизь, кожа, капсула и др. Для дрожжей в литературе чаще всего при обозначении внеклеточного материала используется термин «капсула». Биохимический анализ внеклеточного чехла у ряда грибов выявил присутствие полисахаридов (*β*-1,6-глюканов, β-1,3-глюканов) и гликопротеинов, то есть по химической структуре он близок к наружному слою клеточной стенки и соответственно может быть развит в большей или меньшей степени. В первом случае его принято рассматривать как самостоятельный слой клеточной стенки и называть капсулой. При развитии чехла, окружающего клетки грибов, его наружные слои содержат белки (в том числе и гликозилированные), такие как гидрофобины, адгезины и т.д. Капсула может иметь небольшую толщину (микрокапсула) или превышать диаметр клетки в 2–3 раза (*Cryptococcus neoformans*). Размеры капсулы зависят от вида дрожжей и условий среды обитания.

В последние годы появилось много работ по исследованию функций и строения слизистого чехла у разных грибов. Ему приписывают роль в узнавании субстрата, адгезии, аккумуляции и сохранении компонентов клеточной стенки, модификации внеклеточного ионного окружения, сохранении от высыхания и неблагоприятных изменений окружающей среды, связывании гиф вместе, дополнительного источника питания и места локализации природных ассоциантов (например, бактерий).

Так, например, гидрофобный внеклеточный матрикс патогена человека, возбудителя микоза легких *A. fumigatus*, состоит из комплекса веществ: галактоманнана, α-1,3-глюкана, моносахаридов, полиолов, меланинов и гидрофобинов. При росте на агаризованной среде мицелиальная колония *A. fumigatus* окружена пленкой из внеклеточного матрикса. Подобная пленка образуется и мицелием базидиального дереворазрушающего гриба вешенки.

Чаще всего морфологическое описание внеклеточного материала не сопровождается сведениями о его составе. Несмотря на многочисленные сведения о чехлах у дереворазрушающих базидиомицетов, его состав во многом неизвестен. Чехол защищает клетки мицелия трутовиков от высыхания, а также формирует контактную поверхность с субстратом.

Изучение ультраструктуры клеток воздушного мицелия вешенки легочной *Pleurotus pulmonarius*, а также мицелия и хламидоспор серно-желтого трутовика *Laetiporus sulphureus* также выявило наличие чехла, окружающего клетки (рис. 11). В некоторых случаях размеры чехла вешенки легочной могут достигать нескольких десятков микрон. Слизистые покровы вешенки и серно-желтого трутовика выполняют, по-видимому, важную роль в межклеточных контактах и защите гиф от высыхания.

На рис. 12 продемонстрирован внеклеточный материал спор разных грибов, обеспечивающий их адгезию к субстрату.

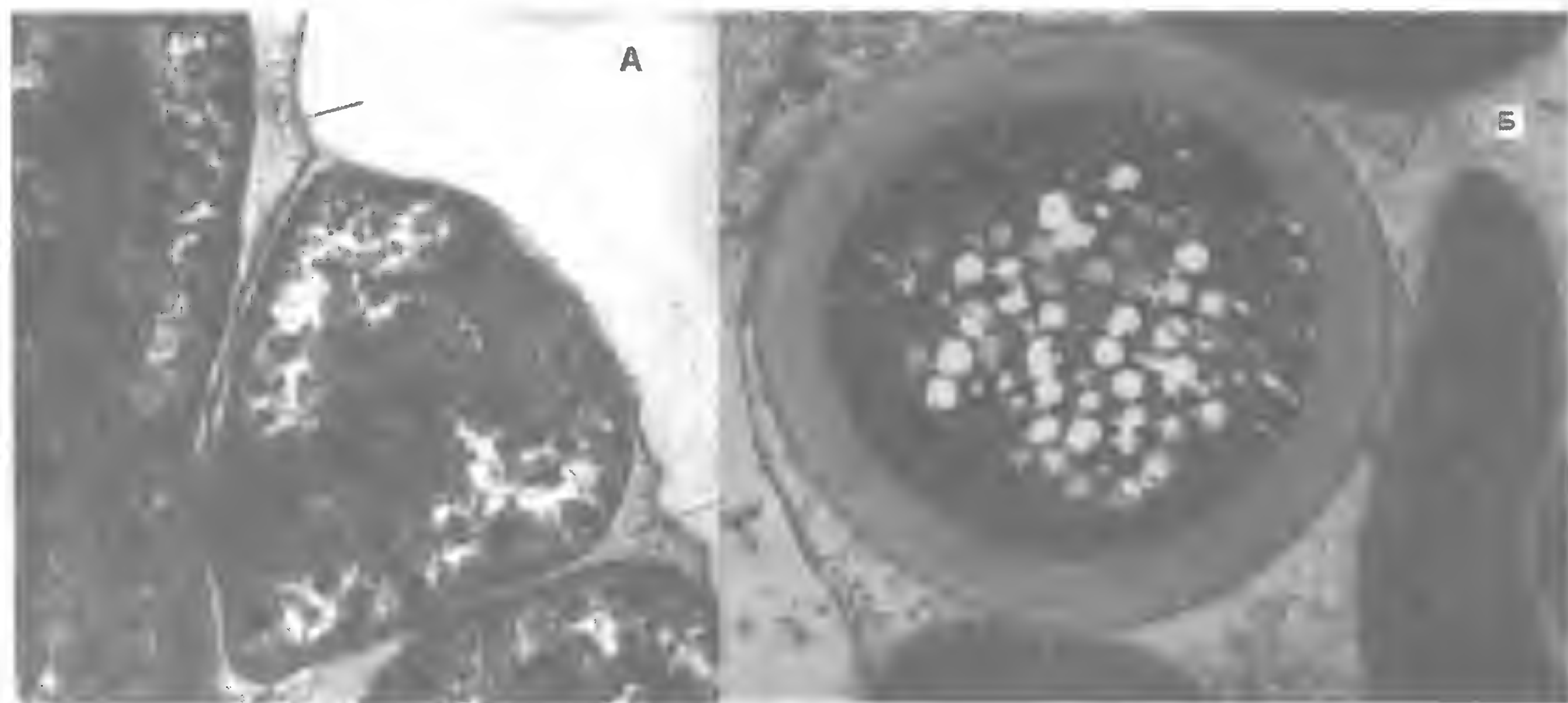


Рис.11. Чехол вокруг клеток мицелия вешенки легочной (А), хламидоспоры и мицелия серно-желтого трутовика (Б). Масштабные отрезки 0,5 (А) и 2 мкм (Б).

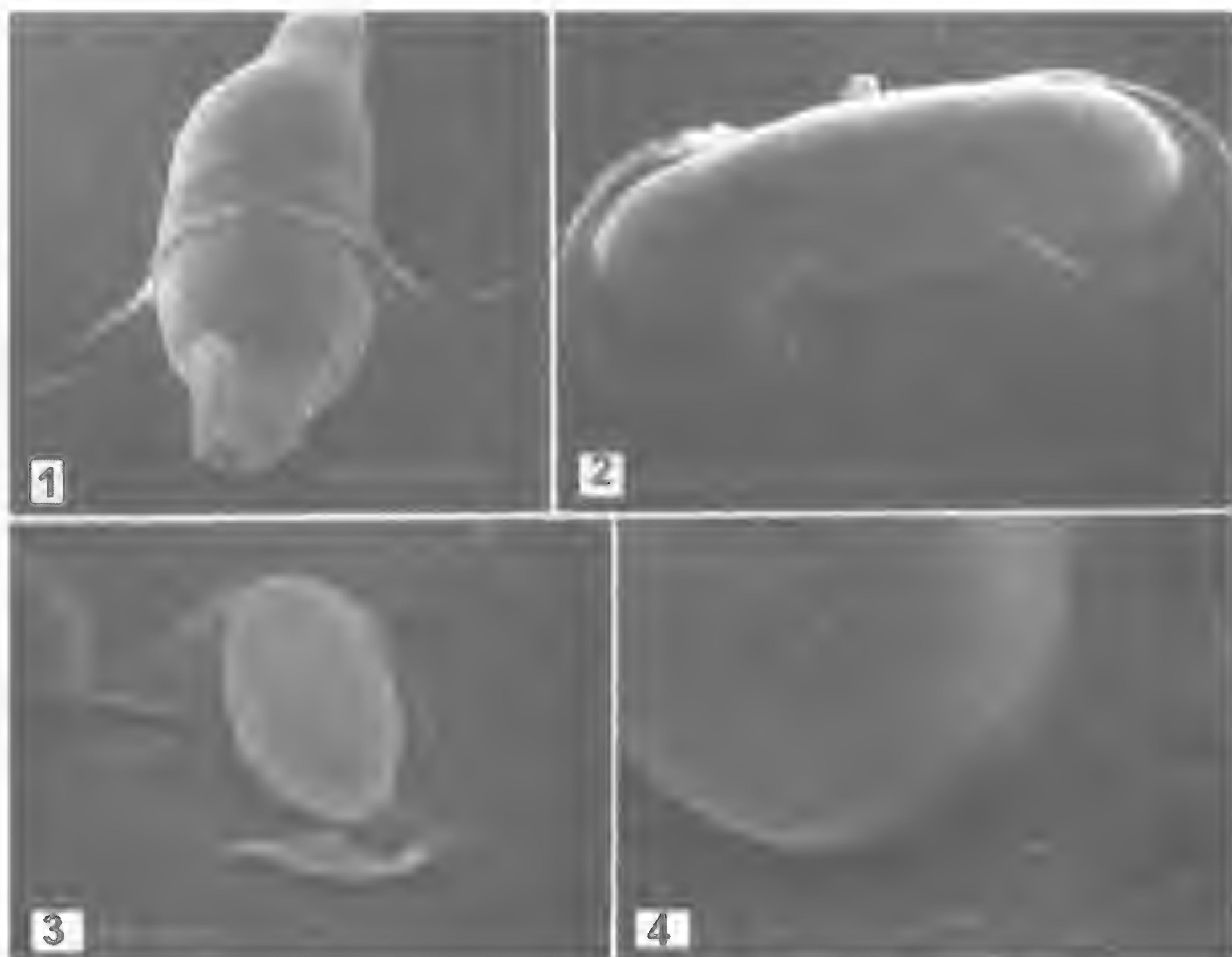


Рис. 12. Адгезия спор к субстрату. СЭМ

1. Аскоспора *Ceriosporopsis tubulifera* с кольцевым придатком в области экватора, образующим места прикрепления (стрелки) к субстрату.
2. Прикрепление аскоспоры *Remispora galerita* полярными придатками к поверхности

3, 4. Обертка аскоспоры *Sordaria fimicola* из слизистого чехла (3) и прикрепление к субстрату (4) Масштабные отрезки 10 мкм (Jones, 1992).

2.4.4. Характеристика минорных компонентов клеточной стенки грибов

Клеточные стенки также содержат минорные компоненты. включающие липиды, пигменты, неорганические соли.

Липиды встречаются в клеточной стенке обычно в небольшом количестве (в основном в спорах), но выполняют очень важную функцию для сохранения жизнеспособности спор (их гидрофобность). У спор, по сравнению с мицелием, липиды представляют менее насыщенную форму жирных кислот. Вместе с гидрофобинами липиды контролируют транспорт воды и осуществляют защиту от высыхания.

Клеточные стенки грибов также содержат темноокрашенный пигмент меланин, который прочно связан с разными слоями клеточной стенки мицелия и спор и создает разные оттенки окраски от темно-коричневого до черного. Грибной меланин (алломеланин) представляет собой высокомолекулярное соединение, продукт окисления и полимеризации безазотистых соединений фенольной природы, в его структуре присутствуют конденсированные ароматические ядра. Меланин высоко резистентен к химической и энзиматической атакам, а также вносит вклад в вирулентность многих патогенных грибов (например, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* и *Coccidioides posadasii*), снижая чувствительность меланизированных грибов к защитным механизмам хозяев и лекарственным препаратам. Грибы с меланизированными клеточными стенками обладают повышенной устойчивостью к электромагнитному и ионизирующему излучениям; пигмент, по-видимому, обеспечивает клетки физическим экраном (от УФ) и улавливает токсичные для клетки свободные радикалы (вызванные ионизируюшей радиацией). Меланин также может обеспечивать устойчивость клеточных стенок к лизису литическими ферментами. Так, стенки меланин-дефицитных линий ряда грибов более легко перевариваются хитиназами, чем стенки пигментированных линий

Фитопатогенные грибы с меланизированными аппрессориями, такие как *Magnaporte grisea* или виды рода *Colletotrichum,* успешно проникают в клетки хозяев. Мутанты, дефицитные по меланину, авирулентны. Меланин аппрессория ограничивает проницаемость клеточной стенки, способствует накоплению осмолитов и созданию тургорного давления внутри аппрессория. Для других фитопатогенных грибов меланин не является фактором вирулентности. Мутации по меланину не влияют на проникновение и распространение мицелия в тканях/межклетниках растения-хозяина, но немеланизированные микросклероции *Verticillium dahlia* менее устойчивы к действию УФ. Меланин-дефицитные мутанты *Monilinia fructicola* формируют конидии, чувствительные к высокой температуре, высыханию, замораживанию, УФ, действию литических ферментов.

Другой ароматический полимер, накапливающийся в оболочках спор грибов — спорополленин (у *N. crassa*, *Mucor mucedo*), который защищает споры от химических и физических факторов окружающей среды.

Таким образом, спорополленин, меланин и родственные полимеры (такие как зеленые пигменты конидий видов *Penicillium* и

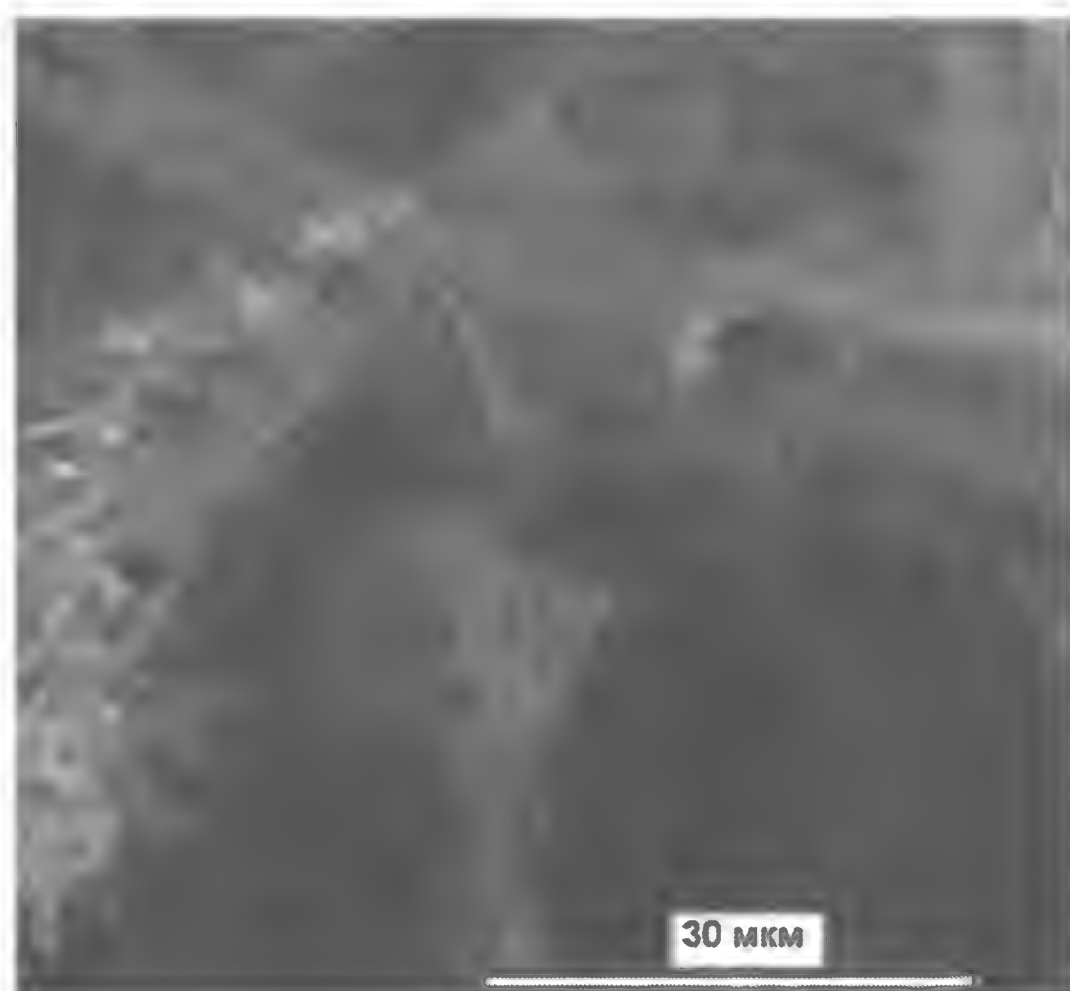


Рис. 13. Кристаллы оксалата кальция, инкрустирующие гифы *Agaricus bisporus*.

Trichoderma) обеспечивают механическую прочность грибным стенкам и защищают грибные клетки от ряда возникающих стрессов, таких как УФ, солнечная радиация, обезвоживание, ферментативный лизис и некоторые другие.

На поверхности воздушных вегетативных гиф и спорангиев часто отмечают наличие кристаллов оксалата кальция. Функции кристаллов оксалата кальция у грибов полностью неясны. Среди функций, приписываемых им — нейтрализация щавелевой кислоты, создание гидрофобного покрытия различных структур грибного мицелия и аккумуляция ионов кальция (рис. 13).

2.5. Биосинтез клеточной стенки грибов

Биосинтез клеточной стенки грибов представляет собой комплексный феномен и происходит в трех местах: цитозоле, плазматической мембране и самой клеточной стенке. Стенка, как было описано выше в разделе 2.3, состоит из нескольких компонентов. Структурные полимеры, такие как хитин, β-(1→4)- и β-(1→3)-связанные глюканы синтезируются векторно трансмембранными синтазами, получающими предшественники в виде нуклеотидсахаров из цитозоля и снабжающими полимеризованными цепями клеточную стенку. Матриксные полимеры (глюканы, гликопротеины) синтезируются внутриклеточно и через цитоплазматический секреторный путь, включающий эндоплазматический ретикулум, везикулы Гольджи и секреторные везикулы доставляются к клеточной стенке. Окончательная организация стенки, включающая модификацию полимеров и их ковалентное перекрестное связывание, происходит в самой стенке.

Синтез клеточной стенки представляет собой поляризованный процесс, связанный с транспортом компонентов и биосинтетических ферментов к местам роста. Эта функция зависит от цитоскелета, который обусловливает перемещение всех этих компонентов, находящихся внутри секреторных везикул и микровезикул, к местам синтеза и растяжения стенки. В периплазматическом пространстве клетки компоненты стенки ассоциируют и образуют трехмерную структуру, поддерживаемую и организованную нековалентными и ковалентными связями. Этот процесс находится под контролем регуляторного механизма/ов, который предусматривает изменения в стенке как качественные, так и количественные в ответ на внутренние и наружные эффекторы. Индуцируемые изменения позволяют грибам менять свою морфологию в течение клеточного и жизненного циклов, а также при взаимодействии с другими организмами для оптимального взаимодействия с окружением грибов или адаптации к разным типам стресса путем снижения доли одних компонентов стенки и повышения синтеза других.

2.5.1. Синтез хитина

Синтез хитина осуществляется хитинсинтазой (ХС) в местах активного роста клеток грибов и реконструкции клеточной стенки (апекс, места ветвления и др.). ХС встраивается в цитоплазматическую мембрану и, захватывая две молекулы УДФN-ацетилглюкозамина в цитоплазме, добавляет их к имеющейся хитиновой цепи (рис. 14).

Специфическая роль ХС у некоторых грибов изучена методами генетического и биохимического анализа. Большинство грибов имеет несколько генов ХС: их число колеблется от одного у *S. pombe* до десяти у некоторых мицелиальных грибов таких, как *A. fumigatus.*

Все исследованные ХС активировались в присутствии УДФN-ацетилглюкозамина и его олигомеров и нуждались в фосфолипидном окружении для своей активности. Большинство изученных ХС синтезировалось в виде зимогенов, т.е. проферментов, требующих активации специфическими пептидазами. Эта протеолитическая активация важна для времен-

ной и пространственной регуляции фермента, локально активируя его в мембране, где и когда его активность требуется.

Хорошо изученный синтез хитина в *S. cerevisiae* включает, по меньшей мере, три ХС I, II и III, которые имеют различные свойства и участвуют в различных клеточных процессах. В отличие от ХС III, которая не требует протеолитической активации и демонстрирует активность при pH 8,0 в присутствии Co^{2+}, ХС I и ХС II синтезируются в виде зимогенов. ХС I имеет оптимум pH 6,5 в присутствии Mg^{2+}, а ХС II — 7,5–8,0 в присутствии Co^{2+}.

Зимоген ХС I наиболее представлен в дрожжевых клетках. Однако разрушение ее гена не влияло на синтез хитина в течение нормального роста клеток. Явной особенностью этих мутантов была тенденция к утечке клеточного содержимого из септы вслед за освобождением дочерней клетки при росте на средах с низким pH. Отделение дочерней клетки включает действие хитиназы, чья сверхактивность особенно при кислых pH и приводит к утечке клеточного содержимого. В клетках дикого типа этот процесс корректируется синтезом хитина, осуществляемым как раз ХС I. Таким образом, ХС I выступает в дрожжевых клетках в качестве репарирующего фермента. ХС II, вероятно, ответственна за синтез хитина в первичных септах. Во всяком случае, мутанты по гену ХС II их не образовывали и демонстрировали рост с ошибочными клеточными формами и размерами. Анализ мутантов, дефицитных по гену ХС III, показал, что этот фермент ответственен за синтез хитина в течение нормального роста, спаривания и споруляции. Так, спаривающиеся дрожжевые клетки имеют возросшее содержание хитина в стенке их конъюгационных трубок, для синтеза которого требовалась экспрессия гена ХС III.

ХС, изученные у разных грибов, очень сильно и специфично ингибируются двумя родственными семействами антибиотиков полиоксинами и никомицинами, продуцируемыми живущими в почве видами *Streptomyces*. Будучи структурными аналогами УДФN-ацетилглюкозамина эти нуклеозидпептиды ингибируют ХС конкурентным образом. У обработанных полиоксином или никомицином грибов верхушки гиф быстро набухают и «взрываются»; делящиеся дрожжевые клетки также формируют «взрывающиеся пары» с нарушенным разделением дочерней клетки и материнской. Были попытки использовать полиоксины в качестве сельскохозяйственных фунгицидов, однако к ним быстро развивается устойчивость, т.к. обработанные грибы изменяют свою пептид-потребляющую систему, которая прекращает транспортировать антибиотики в клетку.

УДФN-ацетилглюкозамин, являющийся субстратом для ХС, а также для ферментов, добавляющих УДФN-ацетилглюкозамин к гликопротеинам, синтезируется последовательно 6 ферментами, все из которых найдены в грибах и охарактеризованы. Этот путь регулируется по принципу обратной связи уровнем образованного УДФN-ацетилглюкозамина.

В метаболизм хитина также вовлечены еще три фермента: хитиназа, N-ацетилглюкозаминидаза и N-ацетилглюкозаминкиназа. Эти три фермента необходимы для рециклизации собственного хитина и утилизации экзогенного хитина. Следует отметить важную роль хитиназы в процессе морфогенеза гиф. Она всегда присутствует в активной форме в экспоненциально растущих клетках и, вероятно, регулирует пластичность расширяющихся областей стенок в течение ветвления и, возможно, в течение апикального роста гиф. Чрезвычайно важна ее роль при почковании дрожжевых клеток. Клетки *S. cerevisiae* с разрушенным хитиназным геном накапливаются как конгломерат, т.к. дочерние клетки не способны отделиться от материнских. Такой же эффект наблюдается, когда дрожжевые клетки растут в присутствии аллозамидина, антибиотика, специфически ингибирующего хитиназу.

Образование водородных связей между вновь сформированными цепями хитина приводит к формированию микрофибрилл и последующей кристаллизации хитина во

внеклеточном пространстве непосредственно на границе с плазматической мембраной. Процесс синтеза хитина называют векторным, так как он протекает строго в одном направлении и встречается в местах активного роста (апекс гифы) и реконструкции клеточной стенки. У дрожжей включение хитина происходит в таких областях, как макушка дочерней почки в процессе поляризованного роста и район почечного рубца в процессе цитокинеза.

2.5.2. Синтез глюканов

Как и в случае с хитином, полимеры глюкана формируются векторным синтезом при участии, локализованного в плазматической мембране фермента (рис. 14). Линейный полимер β-(1,3)-глюкана синтезируется β-(1,3)-глюкансинтазой, состоящей из мембраносвязанной каталитической субъединицы и растворимой регуляторной субъединицы со свойствами ГТФ-связывающего белка. У S. *cerevisiae* гены, кодирующие интегральный мембранный белок, были названы *FKS1* и *FKS2*. *FKS1* экспрессируется при росте клеток на глюкозе, а *FKS2* при росте на бедных средах по углероду или при высоком уровне внеклеточного кальция, или в присутствии феромона. Важную роль в активации β-(1,3)-глюкансинтазы играют маленькие ГТФ-связывающие белки (G-белки), в частности Rho1. Этот белок был обнаружен в сайте почкования в месте локализации актина и белка Fks1. Оба белка (Rho1и Fks1) перемещаются в перешеек между материнской и дочерней клеткой во время формирования септы. Каталитическая форма глюкансинтазы в это время может находиться в неактивной форме. По мере накопления в месте почкования Rho1, происходит обмен ГДФ на ГТФ, вызывающий конформационные изменения, которые способствуют связыванию Rho1 с каталитической субъединицей. Это связывание в свою очередь вызывает изменение конформации каталитической субъединицы (ворота открыты), открывая активный участок, к которому УДФ-глюкоза может присоединиться. Происходит синтез глюкана с одновременным выбросом полисахарида во внеклеточное пространство, как и в случае синтеза хитина. Возможно опосредованное взаимодействие с актином.

Полисахаридные цепочки β-(1,3)-глюкана достигают длины до 1500 глюкозных остатков и с увеличением степени полимеризации становятся нерастворимы в щелочи. Глюкановые цепи сразу же выбрасываются во внеклеточное (периплазматическое) пространство вокруг цитоплазматической мембраны, что способствует их встраиванию в клеточную стенку в местах ее синтеза. Глюкансинтазы, подобно хитинсинтазам, локализованы в районах активного растяжения гифы, почкования, ветвления или септирования. Синтез β-(1,3)-глюкана в грибах специфически ингибируется эхинокандинами, природными липопептидными антибиотиками. Отсутствие β-(1,3)-глюкана у млекопитающих и его широкое распространение и значимость в грибном царстве делают в настоящее время полусинтетические эхинокандины весьма перспективными в лечении грибных инфекций человека.

Зрелый глюкан имеет дополнительные ответвления от основной цепи в шестом положении углеродного атома глюкозы (β-(1,6)-связанные остатки) в глюкановом полимере (примерно 40–50 точек ветвления на 1500 глюкозных остатков), образуя ветвящуюся структуру глюкана. Однако векториальный синтез β-(1,3)-глюкана позволяет получать только линейные молекулы и поэтому любые β-(1,6)-ветви добавляются к синтезированному глюкану непосредственно в самой клеточной стенке. Этот процесс представляет часть созревания клеточной стенки и встречается в апикальной части растущих гиф.

2.5.3. Синтез гликопротеинов

Гликопротеины клеточной стенки синтезируются и модифицируются комплексным механизмом в процессе переноса через секреторный путь и достигают поверхности клетки в секреторных везикулах.

Большинство гликопротеинов клеточной стенки — это белки, которые связаны с олигосахаридами N- и O-гликозидными связями. Эти белки имеют N-концевой сигнальный пептид, который с помощью сигнал-узнающей частицы обеспечивает прикрепление транслирующей рибосомы к мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР). В процессе синтеза на рибосомах, связанных с ЭР, белок поступает в просвет ЭР и вступает в секреторный путь (рис. 14). В процессе перемещения белка через секреторный путь происходит его гликозилирование.

2.5.4. Генетический контроль биосинтеза клеточной стенки

Клеточная стенка грибов — многокомпонентная система, состоящая из разных компонентов, синтез и сборка которых происходят при жестком генетическом контроле. У *S. cerevisiae* в биосинтезе клеточной стенки задействовано порядка 20% генома клетки. Прежде всего, это гены, отвечающие за синтез компонентов клеточной стенки (хитина, глюканов, гликопротеинов и т.д.); поляризованный рост и цитокинез; синтез компонентов цитоскелета, принимающего участие в транспорте компонентов клеточной стенки; путей сигнальной трансдукции, отвечающих за поддержание целостности клеточной стенки (подробно см. раздел 2.7). Центральная роль в регуляции синтеза глюканов клеточной стенки, организации актина и доставке везикул принадлежит маленькому G-белку Rho1.

2.6. Динамика синтеза клеточной стенки и преобразования клеточных покровов в процессе морфогенеза

Синтез клеточной стенки в большинстве клеток грибов высоко поляризован; почти весь синтез хитина и глюкана происходит в верхушке гифы величиной 1 мкм. Далее пластичные вновь синтезированные стенки в апикальном куполе постепенно созревают, превращаясь в жесткие боковые стенки гиф. Процесс созревания стенок идет в трех направлениях:

1. перекрестное связывание различных полимеров. Наиболее заметно образование ковалентных связей между хитином и разветвленным β-(1,3)-глюканом;
2. процесс кристаллизации хитиновых микрофибрилл за счет увеличения числа водородных связей;
3. добавление нового материала, ведущее к утолщению микрофибрилл, и накопление матриксных материалов, покрывающих фибриллярный скелет.

В процессе морфогенеза грибов происходят качественные и количественные преобразования клеточных покровов. Эти изменения определяют транспорт питательных веществ, метаболизм непроницаемых для клеточной стенки веществ и в большой степени зависят от функционального статуса клетки (клетка вегетативного мицелия, покоящиеся споры и т.д.).

Рассмотрим несколько примеров вариации состава клеточных стенок на разных стадиях цикла развития (споры и мицелий) у ряда грибов.

У зигомицета *Mucor rouxii* хитина больше всего в клеточных стенках спорангиеносцев и почти нет в спорах. Хитозана в три раза больше в клеточных стенках мицелия по сравнению со спорами. Глюкан всегда присутствует на стадии спор и отсутствует у мицелия *M. rouxii*. А меланин можно обнаружить только в клеточных стенках спор (табл. 1).

Таблица 1

Химические различия в составе клеточных стенок *Mucor rouxii* (Bartnicki-Garcia et al., 1968)

Компонент клеточной стенки	Сухой вес, % общего веса			
	дрожжи	гифа	спорангиеносец	споры
хитин	8	9	18	2
хитозан	28	33	21	10
манноза	9	2	1	5
фукоза	3	4	2	0
галактоза	1	2	1	0
глюкуроновая кислота	12	12	25	2
глюкоза	0	0	0,1	43
белок	10	6	9	16
липид	6	8	5	10
фосфат	22	23	1	3
меланин	0	0	0	10

Хитин присутствует у аскоспор и отсутствует в клеточных стенках дрожжевой стадии *S. pombe*. А хитозан является маркером клеточных стенок аскоспор *S. cerevisiae*, но отсутствует у вегетативных почкующихся клеток.

Анализ химического состава клеточных стенок базидиомицета шампиньона двуспорового показал, что основу клеточной стенки мицелия составляет хитин и щелоченерастворимый глюкан, а у спор — комплекс меланина и хитозана (табл. 2).

Таблица 2

Очищенная фракция бесцветных клеточных оболочек вегетативного мицелия шампиньона содержит (% сух вес) (Michalenko et al., 1976)

Компоненты клеточной стенки	Мицелий	Споры
хитин	43	5
щелоченерастворимый глюкан	26	–
щелочерастворимый глюкан	14	–
белок	16	26
липиды	15	13
ксиломаннан	следы	-
меланин	–	41
хитозан	–	15

Рассмотрим пример реорганизации клеточной стенки у патогенного гриба *A. fumigatus* в процессе прорастания конидии. Конидии гриба *A. fumigatus* имеют двойную клеточную стенку с наружным слоем, содержащим меланин (рис. 15), и покрыты слоем гидрофобного белка. Состав клеточной стенки конидий до конца неизвестен. Показано, что в ней присутствует β-1,3-глюкан. В процессе первой стадии прорастания происходит гидролиз полисахаридов и ее размягчение. Параллельно с этим синтезируется *de novo* электронно-прозрачный слой *m*, который и окружает гифу (рис. 15). В отличие от конидий состав клеточной стенки мицелия детально изучен (см. рис. 8А), он представлен двумя слоями полисахаридов (щелоченерастворимого и щелочерастворимого) и не содержит меланина.

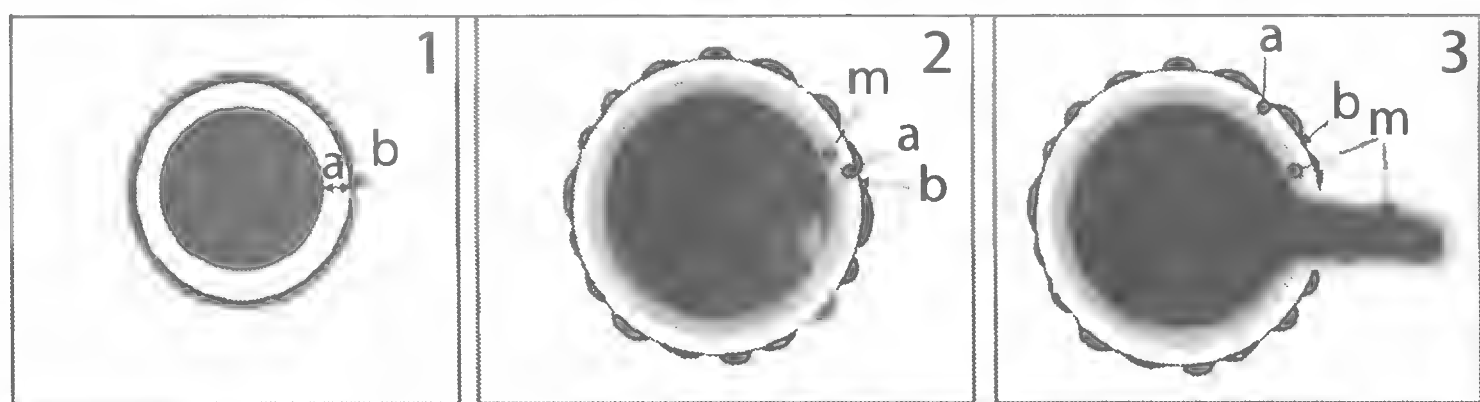


Рис. 15. Схема преобразования клеточной стенки в процессе прорастания конидии *Aspergillus fumigatus*
1. Клеточная стенка конидии с электронно-прозрачным внутренним слоем (a) и наружным меланин-содержащим слоем (b).
2. Растяжение клеточной стенки конидии и синтез нового слоя (m) в процессе набухания конидии.
3. Клеточная стенка мицелия с одним слоем (m), который образуется из *de novo* синтезирующегося внутреннего слоя прорастающей конидии (Latge et al., 2005).

В течение последних нескольких лет было показано, что, несмотря на крайне динамичную конструкцию клеточной стенки дрожжей и мицелиальных грибов, имеется сходный механизм ее восстановления и ремоделирования при участии ферментов клеточной стенки Повреждение клеточной стенки у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* запускает репарационный механизм, названный путем поддержания целостности клеточной стенки (cell-wall-integrity pathway, CWI-путь), представленный, по крайней мере, 18 генами, контролирующими сохранность клеточной стенки, и регулируемый единственным транскрипционным фактором и специфическим путем сигнальной трансдукции. Последовательность синтеза клеточной стенки имеет общие черты для нескольких изученных в данном отношении дрожжей и мицелиальных грибов.

В дополнение имеется много наблюдений по формированию *вторичных стенок* гиф, которые синтезируются как утолщение внутреннего слоя клеточной стенки и состоят из толстых фибрилл глюкана. Глюканы накапливаются в клеточных стенках, например, в процессе финальных стадий созревания плодовых тел базидиомицетов при отсутствии требующихся внеклеточных источников азота или углерода. В процессе развития плодовых тел *Schizophyllum commune* щелочерастворимый компонент клеточной стенки, названный R-глюкан, является главной фракцией стенки. R-Глюкан содержит как β-1,6-, так и β-1,3-связи и отличается от щелочерастворимого S-Глюкана.

2.7. Участие клеточных стенок в установлении и развитии патогенных и симбиотических связей между грибами и другими организмами

Предварительное требование при патогенезе — это адгезия грибов с поверхностью их хозяев. Так, клетки патогена *C. albicans* слипаются с эпителиальными клетками человека. При этом прослеживается связь с вирулентностью: клетки менее вирулентного вида демонстрируют меньше слипаний. В этом процессе явно задействованы белки, т.к. в присутствии протеиназ наблюдается сильное снижение адгезии. Получены доказательства того, что наблюдаемое слипание обусловлено связыванием маннопротеинов на поверхности клеток *C. albicans* с фукозо-содержащим гликопротеином на поверхности эпителиальных клеток. Заметные изменения клеточной поверхности происходят и при переходе от дрожжевой формы *C. albicans* к более патогенной мицелиальной. Дрожжевые клетки

в культуре в норме не агрегируют, но интенсивная агрегация сопровождает индукцию роста гиф.

Сходным образом прикрепление нематодо-патогенных грибов к их хозяевам-нематодам происходит за счет связывания специфического гликопротеина (лектина) на их поверхности с N-ацетилгалактозамин-содержащим рецептором на поверхности нематоды.

Участие агглютининов клеточной поверхности показано также в прикреплении проростковых трубок *микопаразита* к стенкам гиф хозяина и при взаимодействии конидий рисового патогена *Magnaporthe grisea* с гидрофобной листовой поверхностью риса. В последнем случае, вероятно, маннопротеин клеточной стенки гриба обеспечивает адгезию за счет связывания с конканавалином А, растительным лектином, имеющим высокое сродство к маннозе.

Меланины клеточных стенок также участвуют в патогенезе растений и животных. Меланин может придавать большую мощь грибным стенкам и отложения меланина играют ключевую роль в развитии гидростатического давления, которое позволяет аппресориям рисового патогена *M. grisea* проникать в растительные ткани. Аппресории меланин-дефицитных мутантов или грибов, обработанных ингибиторами биосинтеза меланина, не способны проникать в листовую ткань. Образование меланина влияет и на вирулентность патогенных грибов *Cryptococcus neoformans* и *Wangiella dermatitidis*, т.к. меланин-дефицитные штаммы обоих грибов оказывали пониженное патогенное влияние на мышей. В этих случаях меланин, возможно, участвует в защите грибных клеток от химических защитных механизмов хозяина.

Многие виды растений образуют микоризные ассоциации с грибами. И в этом процессе важную роль играют гликопротеины или олигосахаридный материал клеточных стенок, включающиеся в установление контактов между грибом и его растением-хозяином.

Архитектура и структура клеточных стенок патогенных или симбиотических грибов может изменяться в процессе взаимодействия с хозяином. Так, гифы грибов из отдела Glomeromycota проникают в кортикальные клетки корня и развиваются в ряд специализированных структур. При этом грибные клеточные стенки модифицируются: они становятся тоньше (до 20–30 нм) и их структура изменяется от волокнистой до аморфной. Аморфные стенки еще содержат хитин и глюкан, но не кристаллические и без перекрестно-связанных форм. По-видимому, утоньшение стенок и их большая аморфность способствуют перекрестным потокам питательных веществ и других молекул между симбионтами.

Наоборот, при патогенезе клеточные стенки грибов становятся толще, давая клеткам большую физическую и химическую защищенность против защитных механизмов хозяев. Так, дрожжеподобный базидиомицет *C. neoformans* в человеческой ткани образует мощную полисахаридную капсулу, которая состоит главным образом из α-1,3-маннозного остова с замещениями ксилозой и глюкуроновой кислотой с различной степенью О-ацетилирования. Эта полисахаридная капсула придает патогену устойчивость к фагоцитозу и является главным фактором вирулентности.

2.8. Сигнальные пути сборки клеточной стенки и ответ на стресс

Известным компенсаторным ответом на стресс у *S. cerevisiae* и мицелиальных грибов является повышенный синтез хитина. У *S. cerevisiae* клеточная стенка требуется для поддержания формы клетки, которая важна для почкования. Дрожжевая клетка через сигнальные пути сборки клеточной стенки изменяет свою жесткую структуру, приспосабливая ее к растяжению клетки при вегетативном размножении, феромон-индуцированном морфогенезе и управляемом питанием нитевидном росте. Дефекты или опасность для клеточной стенки индуцируют клетки к активации путей поддержания целостности клеточной стенки (CWI-путь), деятельность которых характеризуется увеличением содержания хитина.

Сигнальные пути поддержания целостности клеточной стенки у грибов активируются в ответ на низкое осмотическое давление среды, температурный стресс, феромоны спаривания и др. Они включают семейство поверхностных сенсорных белков, спаренных с ГТФ-связывающим белком Rho1p, который активирует каскад CWI через MAPK протеинкиназу C-Pkc1p. Этот сигнальный каскад активирует экспрессию генов, кодирующих белки клеточной стенки, которые стабилизируют клеточную стенку. Rho1p также активирует комплект дополнительных эффекторов, таких как белки формины Bni1p и Bnr1p, транскрипционный фактор Skn7p и компонент *экзоцисты* Sec3p, который регулирует разные процессы, включая синтез β-глюкана в местах ремоделирования клеточной стенки, экспрессию генов биогенеза клеточной стенки, организацию актинового цитоскелета, привязку секреторных везикул к месту роста.

Семейство сенсорных белков клеточной поверхности отвечает за определение и передачу сигнала на Rho1p. Эти сенсорные молекулы включают белки: Wsc1p (Hcs77p/Slg1p), Wsc2p и Wsc3p, Mid2p и Mtl1p. Среди стрессовых сенсоров Wsc1p и Mid2p наиболее важны и отчасти перекрывают друг друга в передаче сигнала на CWI-путь. Высокое О-маннозилирование Mid2p и Wsc1p важно для их стабильности. Снижение О-маннозилирования приводит к некорректному протеолитическому расщеплению этих белков, что вызывает замедление активации пути через Pkc1 и, в конечном итоге, приводит к смерти клеток без осмотической стабилизации. Совсем недавно было показано, что N-гликан непосредственно участвует в поддержании чувствительности Mid2p. Было обнаружено, что связь с N-гликаном и удаленность от плазматической мембраны влияют на функции Mid2p. Не-N-гликозилированный хвост Mid2p не воспринимает сигналы. Эти наблюдения показали, что N- и О-гликозилирование является важным для поддержания чувствительности CWI-пути, биогенеза клеточной стенки и поляризованного роста у дрожжей.

Присутствие генов, кодирующих белки гомологичные дрожжевым Rho1p, Rho3p и Cdc42p у *A. fumigatus,* предполагает, что пути CWI у них сходны. Увеличение экспрессии и активация MpkAp *A. fumigatus* ортолога Mpk1p *S. cerevisiae* также индуцируются повреждением клеточной стенки. Стало понятно, что, как и у дрожжей, дефекты сборки клеточной стенки запускают каскад MAPK CWI и у *A. fumigatus*. Хотя в отличие от дрожжей, очень мало известно о сенсорах стрессового воздействия на клеточную стенку *A. fumigatus*.

2.9. Химический состав клеточной стенки, таксономическое положение и эволюция грибов

Сравнительный анализ эволюционных деревьев, основанный на ядерной рДНК и снабженный временнóй геологической шкалой, показал, что присутствие или отсутствие какого-либо компонента клеточной стенки часто, но не всегда коррелирует с таксономическим положением и эволюцией грибов (рис. 16).

Присутствие внеклеточного хитинового матрикса предполагает общего предка грибов и животных, жившего более 1 миллиарда лет назад. Отделение грибов от животных произошло после появления β-1,3-глюкана в клеточной стенке, вероятно, как «внеклеточного гликогена». Клеточные стенки *Blastocladiella emersonii* и некоторых видов *Allomyces* (Chytridiomycota) значительно отличаются от грибного предшественника, содержащего хитин и глюкан, которые позднее присутствуют в большом количестве у всех грибов. Эти два полисахарида появляются первыми у синтезирующих клеточную стенку представителей грибного царства. Состав клеточной стенки претерпевал прогрессивные или регрессивные изменения. Например, эволюционный тупик у одной из ветвей Zygomycetes пор. Mucorales заключается в утрате β-1,3-глюкана и появлении деацетилированного хитина и полимеров уроновых кислот. Модификации состава клеточных стенок у других порядков заключаются главным образом в

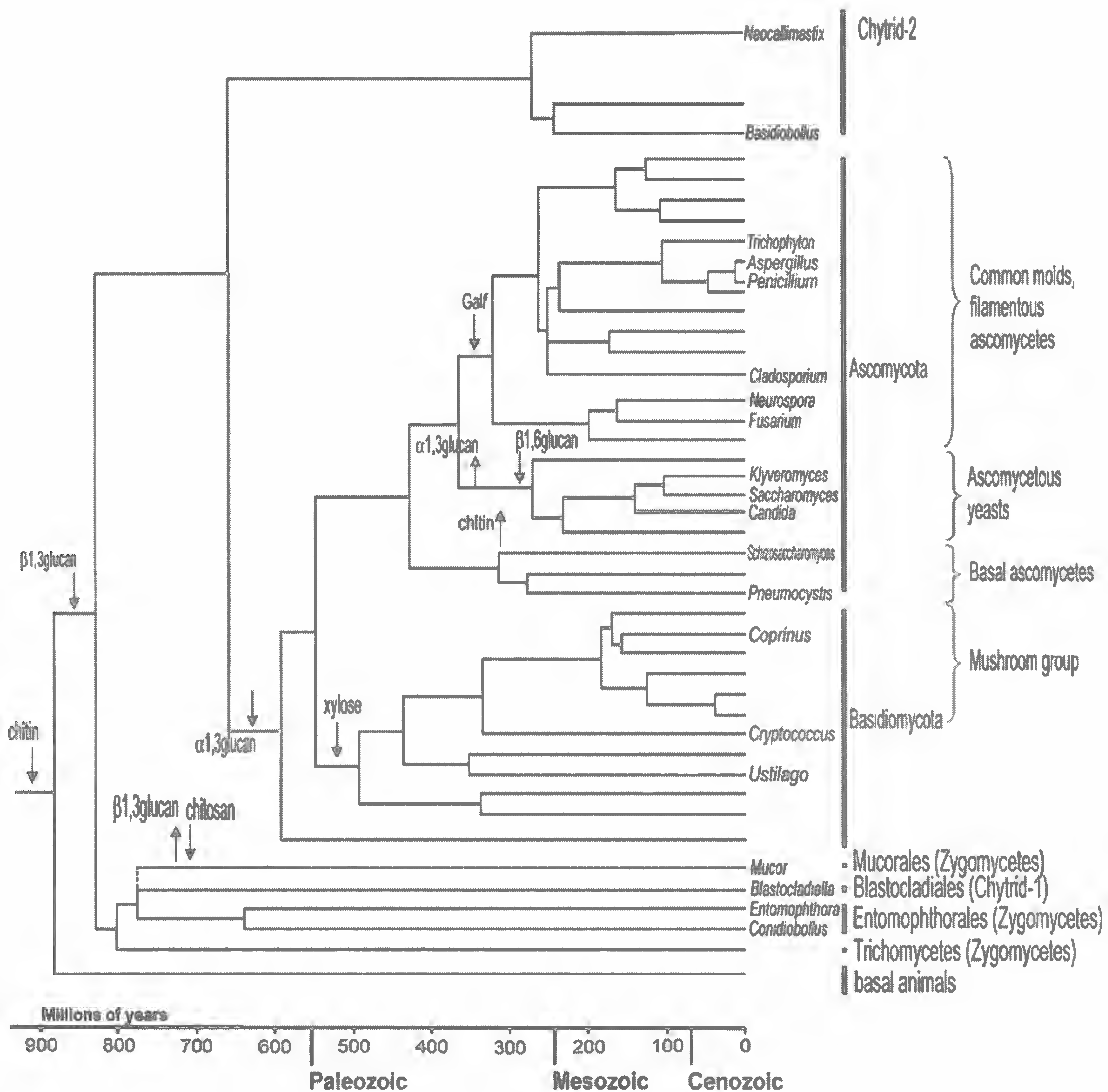


Рис. 16. Появление полисахаридов в КС грибов, основанное на таксономическом положении по отношению к временной геологической шкале (стрелка ↓ — появление полисахарида, стрелка ↑ — утрата полисахарида) (Latge, Calderone, 2006).

комплексном видоизменении β-глюкан-хитинового скелета. Особая прогрессивная ступень эволюции — появление α-глюкана у аско- и базидиомицетов. Пентозы (ксилоза и арабиноза) — отличительный признак базидиомицетов. Галактофураноза встречается, по-видимому, у недавно эволюционировавших групп среди высших аскомицетов. Несмотря на то, что структурная ветка β-1,3-глюкана и хитина достаточно стабильна с момента возникновения грибов, состав других полисахаридов, таких как маннаны, постепенно эволюционирует во времени. Например, если короткие маннановые цепи были частью N-гликана у предков грибов, эти маннановые цепи эволюционируют во времени и превращаются в нековалентно

связанные покровы на поверхности клеток дрожжей и затем — в конститутивный компонент клеточной стенки мицелиальных аскомицетов.

Таким образом, рассмотрение представленного в этой главе материала свидетельствует о том, что клеточная стенка является прекрасной защитой грибной клетки. Из-за своей механической прочности клеточная стенка обеспечивает защиту от осмотического разрыва и окружающих стрессов. Специфические компоненты клеточной стенки защищают от повреждения ультрафиолетом, радиацией, органическими растворителями, токсическими соединениями, ферментативного лизиса и обезвоживания. Но при всем вышесказанном, следует понимать, что это все-таки уязвимая защита. Биосинтез клеточной стенки является мишенью ряда сельскохозяйственных фунгицидов и антимикотиков, таких как полиоксин, ингибирующий хитинсинтазу, ингибитора биосинтеза меланинов трициклазола и производных эхинокандина, ингибирующих синтез глюканов. Растения, беспозвоночные, почвенные микроорганизмы используют литические ферменты (наиболее важны среди них хитиназы и глюканазы) для ослабления или переваривания клеточных стенок грибов. Некоторые линии дрожжевых клеток продуцируют токсины-киллеры, убивающие клетки чувствительных линий. При этом, именно компоненты клеточной стенки являются первичными местами узнавания для этих токсинов, и различные токсины узнают различные рецепторы клеточных стенок, связываясь с ними в качестве предварительного шага до последующего достижения рецепторов плазматической мембраны.

Литература

Калебина Т.С., Кулаев И.С. 2001. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей // Успехи биологической химии. Т.41. С.105–130.

Мысякина И.С., Бокарева Д.А., Усов А.И., Феофилова Е.П. 2012. Различия в составе углеводов дрожжеподобных клеток и мицелия *Mucor hiemalis* // Микробиология. Т.81. № 4. С.443–446.

Феофилова Е.П. 1983. Клеточная стенка грибов. М.: Наука. 248 с.

Феофилова Е.П. 2010. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции // Микробиология. Т.79. № 6. С.723–733.

Abu A.R., Murphy R.J., Dickinson D.J. 1999. Investigation of the extracellular mucilaginous materials produced by some wood decay fungi // Mycol. Res. Vol.103. No.11. P.1453–1461.

Bartnicki-Garcia S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi // Annu. Rev. Microbiol. Vol.22. P.87–108.

Beauvais A., Schmidt C., Guadagnini S., Roux P., Perret E., Henry C. et al. 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus* // Cell Microbiol. Vol.9. P.1588–1600.

Bowman S.B., Free S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Review articles // BioEssays. Vol.28. No.8. P.799–808.

Cabib E., Arroyo J. 2013. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall // Nature Reviews. Vol.11. P.648–655.

Cabib E., Drgonová J., Drgon T. 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis // Annu. Rev. Biochem. Vol.67. P.307–333.

Cabib E, Roh D-H, Schmidt M, Crotti L.B. and Varma A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis // The journal of Biological Chemistry. Vol.276. No.23. P.19679–19682.

Casadevall A., Nosanchuk J.D., Williamson P., Rodrigues M.L. 2010. Vesicular transport across the fungal cell wall // Trends in Microbiology Vol.17. No.4. P.158–162.

Cortés J.C.G., Ishiguro J., Durán A., Ribas J.C. 2002. Localization of the (1,3)b-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation,

polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination // Journal of Cell Science. Vol.115. No.21. P.4081–4096.

Dichtl K., Helmschrott C., Dirr F., Wagener J. 2012. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases // Molecular Microbiology. Vol.83. No.3. P.506–519.

Dranginis A.M., Rauceo J.M., Coronado J.E., Lipke P.N. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions // Microbiol Mol Biol Rev. Vol.71. No.2. P.282–94.

Durán A., Nombela C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment // Microbiology. Vol.150. P.3099–3103.

Eisenman H.C., Nosanchuk J.D., Webber J.B.W, Emerson R.J., Camesano T.A., Casadevall A. 2005. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* // Biochemistry. Vol.44. No.10. P.3683–3693.

Farkas V. 2003. Structure and biosynthesis of fungal cell wall: Methodological approaches // Folia microbiology. Vol.48. No.4. P.469–478.

Farkas V. 1979. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi // Microbiological Reviews. Vol.43. No.2. P.117–144.

Gastebols A., Clavaud C., Almanlanda V., Latge J.-P. 2009. *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization // Future Microbiol. Vol.4. No.5. P.583–595.

Gooday G.W. 1994. [Cell walls] // N.A.R. Gow, G.M. Gadd (eds.). The Growing Fungus. London: Chapman & Hall. P.43–62.

Griffin D.H. 1996. Fungal physiology. NJ: John Wiley & Sons. 472 p.

Hardison S.E., Brown G.D. 2012. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. Review // Nature immunology. Vol.13. No.9. P.17–822.

Henson J.M., Butler M.J., Day A.W. 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi // Ann. Rev. Phytopathol. Vol.37. P.447–471.

Hunsley D., Burnett J.H. I970. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi // Journal of General Microbiology. Vol.62. P.203–218.

Jacobson E.S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins // Clinical Microbiology Reviews. Vol.13. No.4. P.708–717.

Jin C. 2012. Protein glycosylation in *Aspergilus fumigatus* is essential for cell wall synthesis and serves a promising model of multicellular eukaryotic development. Review article // International Journal of Microbiology Vol.2012. Article ID 6542516 21 p.

Jones E.B.G. 1994. Fungal adhesion // Mycol. Res. Vol.98. No9. P.61–981.

Kershaw M.J., Talbot N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis // Fungal Genetics and Biology. Vol.23. P.18–33.

Klis F.M., Ram A.F.J., De Groot P.W.J. 2007. [A molecular and genomic view of the fungal cell wall] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). The Mycota VIII. Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition. Berlin Heidelberg : Sringer-Verlag. P.97–120.

Kwan A.H.Y, Winefield R.D., Sunde M., Matthews J.M., Haverkamp R.G., Templeton M.D., Mackay J.P. 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins // PNAS. Vol.103. No.10. P.3621–3626.

Latge J.P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Microreview // Molecular Microbiology. Vol.66. No.2. P.279–290.

Latge J.P., Mouyna I, Tekaia F., Beauvis A., Debeaupuis J.P., Nierman W. 2005. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* // Medical Mycology. Suppl.1. Vol.43. S15–S22.

Latge J.P., Calderone R. 2006. [The Fungal cell wall] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P.73–104.

Lesage G., Bussey H. 2006. Cell wall asssembly in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbial. Mol. Biol. Rev. Vol.70. No.2. P.317–343.

Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi // FEMS Microbiology Reviews. Vol.29. P.877–896.

Lipke P.N., Ovalle R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. Minireview // Journal of Bacteriology. Vol.180. No.15. P.3735–3740.

Manocha M.S., Colvin J.R. 1967. Structure and composition of the cell wall of *Neurospora crassa* // Journal of Bacteriology. Vol.94. No.I. P.202–212.

Michalenko G.O., Hohle H.R., Rost D. 1976. Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus* // J. Gen. Microbiol. Vol.92. No.2. P.251–282.Momany M., Lindsey R., Hill T.W., Richardson E.A., Momany C., Pedreira M., Guest G.M., Fisher J.F., Hessler R.B., Roberts K.A. 2004. The *Aspergillus fumigatus* cell wall is organized in domains that are remodelled during polarity establishment // Microbiology. Vol.150. P.3261–3268.

Montesano M., Brader G., Palva T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. MicroReview // Molecular Plant Pathology. Vol.4. No.1. P.73–79.

Osumi M., Sato M., Ishijima S.A., Konomi M., Takagi T., Yaguchi H. 1998. Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* // Fungal Genetics and Biology. Vol.24. P.178–206.

Ruiz-Herrera J. 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly CRC Press US 188p.

Ruiz-Herrera J., Leon C.G., Carabez-Trejo A., Reyes-Salinas E. 1996. Structure and chemical composition of the walls from the haploid yeast and mycelial form of *Ustilago maydis* // Fungal Genetics and Biology. Vol.20. P.133–142.

Schoffelmeer E.A.M., Klis F.M., Sietsma J.H., Cornelissen B.J.C. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum* // Fungal Genetics and Biology. Vol.27. P.275–282.

Selitrennikoff C.P. 2001. Antifungal Proteins // Applied and environmental microbiology. Vol.67. No.7. P.2883–2894.

Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions Review // Fungal Biology Reviews. Vol.22. P.36–42.

Sietsma J.H., Wessels J.G.H. 2006. [Apical Wall Biogenesis] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P.53–72.

Taborda C.P., da Silva M.B., Nosanchuk J.D., Travassos L.R. 2008. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview // Mycopathologia. Vol.165. No.4–5. P.331–339.

Tokunaga M., Kusamichi M., Koike H. 1986. Ultrastructure of outer most layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique // Electron Microsc. Vol.35. No.3. P.237–246.

Tuason M.M.S., Arocena J.M. 2009. Calcium Oxalate biomineralization by *Piloderma fallax* in response to various levels of calcium and phosphorus // Appl. Environ. Microbiol. Vol.75. No.22. P.7079–7085.

Wessels J.G., de Vries O.M., Ǻsgeirsdóttir S.A., Springer J. 1991. The thn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene // J. Gen. Microbiol. Vol.137. P.2439–2445.

Wessels J.G.H. 1997. Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface // Advances in Microbial. Physiology. Vol.38. P.1–45.

Wősten H.A.B. 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins //Annu. Rev. Microbiol. Vol.55. P.625–646.

Yamaguchi M., Okada H., Namiki Y. 2009. Smart specimen preparation for freeze substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells // Journal of Electron Microscopy. Vol.58. No.4. P.261–266.

Глава 3.
СЕПТЫ И ЦИТОКИНЕЗ У КЛЕТОК ГРИБОВ[1]

3.1. Общие сведения о септе и цитокинезе

Гифы грибов имеют трубчатую форму и окружены прочной клеточной стенкой, которая является хорошей защитой от окружающих факторов среды обитания. Гифа пронизывает субстрат, обеспечивая поступление новых питательных веществ за счет роста кончика гифы. Верхушечный рост происходит посредством добавления нового материала клеточной стенки на самом апексе (см. главу «Апикальный рост»). Показано с использованием электронной микроскопии, что клеточные стенки грибов имеют слоистую структуру, хотя компоненты ее образуют тесно переплетающуюся сеть (см. главу «Клеточная стенка»). У большинства грибов внутренний слой стенки состоит из микрофибрилл хитина и глюкана. Они придают механическую прочность клеточной стенке и способствуют проникновению гифы в пищевые субстраты среды обитания. Наружные слои клеточной стенки состоят из других полимеров, таких как галактоманнаны и ксиломаннаны в форме более аморфных, уплотняющих материалов. Поперечные перегородки (септа, от англ. *septum* — перегородка), которые формируют многие гифы грибов, образуются через определенные интервалы вдоль гифы, имеют высокое содержание хитина и представляют собой жесткие структуры. Септа образуется путем локального растяжения клеточной стенки гифы центрипетально (от периферии к центру). Это может сопровождаться изменениями структуры наружного слоя клеточной стенки в точке развития септы. Таким образом, присутствие септ может создавать дополнительную структурную поддержку и обеспечивать стабильность гифы.

Септирование или формирование септы и *цитокинез* (деление цитоплазмы после митотического деления ядра) — завершающие этапы клеточного цикла, у грибов имеют ряд особенностей. Во-первых, образование септы не всегда приурочено к делению ядра и это

---

[1] Сокращения

ГТФ — гуанозинтрифосфат

ПТВ — полярное тело веретена, центр организации микротрубочек веретена деления у грибов.

СЭМ — сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия

G-белки (англ. G proteins) — это семейство белков, относящихся к ГТФазам и функционирующих в качестве вторичных посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах.

G_1, G_2 — стадии интерфазы клеточного цикла: G_1-фаза (от англ. *gap* — промежуток), или фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов: G_2-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.

IQGAPs — семейство каркасных белков, имеющих множество доменов и названное по имени мотива IQ и домена белка GAP, активируемого ГТФазой

MEN — mitotic exit network — сеть белков, участвующих в выходе клетки почкующихся дрожжей из митоза и вхождении в стадию цитокинеза.

SIN septation initiation network — сеть белков, запускающих септирование у делящихся дрожжей и мицелиальных грибов.

SPC (англ. septal pore cap) — мембранная шапочка, окружающая пору септы, примером SPC является парентосома.

приводит к образованию многоядерных клеток или даже к существованию асептированного мицелия (зигомицеты).

Во-вторых, у грибов можно встретить два типа цитокинеза (*полный и неполный*), обусловленных полным или неполным разделением цитоплазмы между двумя компартментами или между материнской и дочерней клетками. Септа как раз и разделяет цитоплазму материнской клетки на компартменты. Компартментализация может представлять важный механизм защиты цитоплазмы от механического повреждения. Однако во многих случаях центральная часть септы остается открытой большую часть жизни гифы. Большинство септ неполные (т.е. неполный цитокинез), что позволяет свободное сообщение цитоплазмы двух смежных компартментов гифы. Присутствие центральной поры (иногда нескольких пор в мультиперфорированной септе) обеспечивает взаимосвязанность цитоплазмы. Гифа, таким образом, несмотря на компартментализацию в течение наиболее активного периода роста, имеет высокую степень коммуникации между компартментами. Большинство гиф имеют неклеточное строение и содержат много ядер в цитоплазме (ценотическое строение). Полный цитокинез характерен для дрожжей.

3.2. Структура септального аппарата грибов

У грибов наблюдаются разнообразные стратегии септирования с разной степенью сложности формы септы. Рассмотрим основные типы септ у разных групп грибов:

Отдел Chytridiomycota. В норме септы у хитридиевых грибов отсутствуют, кроме некоторых представителей с *микропоровыми* септами (поры с *плазмодесмами* или *десмопоры*) между ризоидальной клеткой и зооспоранигием (табл. 3).

Таблица 3.

Типы септ у разных таксономических групп грибов (Lutzoni et al., 2004)

Таксон	Структура*	Септа
Chytridiomycota		
Allomyces macrogynus		септа с одной центральной микропорой и двумя боковыми порами
Powellomyces variabilis		септа с десмопорами
Zygomycota		
Dimargaris cristalligena		однопоровая двояковогнутая около поры септа с мембранным поровым включением в поровом канале, ассоциированная с мембранными глобулами
Gilbertella persicaria		септа с десмопорами (D)/ плазмодесмами

Ascomycota *Geotrichum candidum* дрожжи	LW D 2.0 μm	септа с десмопорами/ плазмодесмами
Aspergillus nidulans мицелиальный гриб	WB	однопоровая простая септа с тельцами Воронина
Basidiomycota **Urediniomycetes** *Helicobasidium compactum*	MB	однопоровая простая септа с немембранным поровым включением, ассоциированная с микротельцами
Eocronartium muscicola *Melampsora lini*	MB	однопоровая простая септа с немембранным поровым включением, ассоциированная с микротельцами
Ustilaginomycetes *Tilletia barclayana*		однопоровая с небольшим утолщением в районе поры и с мембранными поровыми включениями
Exobasidium karstenii *Ustacystis waldsteiniae*	0.1 μm	однопоровая простая пора с мембранными поровыми включениями
Basidiomycetes *Auricularia auricula-judae*		долипоровая септа с неперфорированной парентосомой
Schizophyllum commune		долипоровая септа с перфорированной парентосомой
Tremella globispora *Trichosporon sporotrichoides*		долипоровая септа с везикулярной парентосомой
Ditangifibulae dikaryotae		долипоровая септа с везикулярной парентосомой

***Примечание:** D — десмопора, LW — латеральная стенка MW — микротельце. WB — тельце Воронина.



Рис. 17. Септированный вакуолизированный мицелий гаплоидного штамма *Podospora anserina.*

Отдел Zygomycota. Гифы зигомицетов не имеют регулярных септ. Исключение составляют представители порядка *Dimargaritales*, клетки вегетативного мицелия которых разделены однопоровыми септами, имеющими двояковогнутые утолщения около поры и мембранное поровое включение в поровом канале. Септа ассоциирована с мембранными глобулами (например, *Dimargaris cristalligena* табл. 3). Септа у зигомицетов формируется в случае изоляции старых/поврежденных участков мицелия или при формировании репродуктивных структур и представляет собой сплошную поперечную перегородку. Необходимо подчеркнуть, что у многих зигомицетов между гаметангием и несущей его клеткой формируется гаметангиальная микропоровая септа, например, у *Gilbertella persicaria* и *Rhizopus stolonifer* (табл. 3).

Мицелий высших грибов (аско- и базидиомицетов) имеет регулярные перфорированные септы (рис. 17), которые так же как и клеточная стенка содержат хитин, отсутствующий у млекопитающих и растений.

Отдел Ascomycota. Септа аскомицетов в норме представлена поперечной перегородкой с центральной порой (табл. 3, рис. 18в), которая сужается по направлению к поровому каналу и обычно ее называют «простой» септой. Диаметр поры варьирует между 50 и 500 нм, что обеспечивает передвижение цитоплазмы в смежных компартментах (у грибов применение терминов «клетка» или «протопласт» в значительной степени некорректно, в данном контексте понимается отделенный септами одно- или многоядерный участок гифы), позволяя проходить митохондриям, ядрам и другим органеллам. Движение цитоплазмы дает возможность связать субапикальный и интеркалярный компартменты молодой гифы с апикальным растущим кончиком, транспортируя питательные вещества и ферменты к апексу, и, таким образом, обеспечивая возможность *соматического* роста.

Несмотря на то, что септа связана с латеральной клеточной стенкой, она может значительно отличаться от нее по химическому составу. К примеру, септальная пластина аскомицетов, кроме хитина, состоит из β-глюканов, при этом α-глюкан, компонент латеральных стенок, не обнаружен. Септа, удаленная от растущего кончика, может быть покрыта аморфным слоем белка. Еще одним важным элементом, характерным для большинства аскомицетов, является ассоциация септы с тельцами Воронина (подробно в главе «Пероксисомы», рис. 18в). Они имеют сферическую или гексагональную форму с диаметром 150–500 нм, состоят из белка, остаются около септы и не имеют тенденции к распространению с током цитоплазмы по длине гифы. Тельца Воронина имеют такой же или чуть больший размер, чем септальная пора, и поэтому могут ее блокировать. Блокировка септы происходит, например, при повреждении или старении клеток мицелия. Не все грибы, принадлежащие к отд. Ascomycota, содержат тельца Воронина, некоторые имеют белковые кристаллы, которые выполняют те же функции, что и тельца Воронина.

Не менее интересны представители отд. Ascomycota с преобладанием дрожжевой фазы в жизненном цикле, но способные к образованию мицелиальных форм, которые отличаются мультиперфорированной септой. Так, например, сахаромицет *Geotrichum candidum* (табл. 3) обладает микропоровой септой с диаметром поры около 9 нм. Число пор в каждой септе может варьировать, достигая максимума 50 пор на септу. Микропоры дают возможность обеспечить цитоплазматическую непрерывность между смежными компартментами гифы, но они слишком малы, чтобы обеспечить ток цитоплазмы, наблюдаемый через крупные поры.

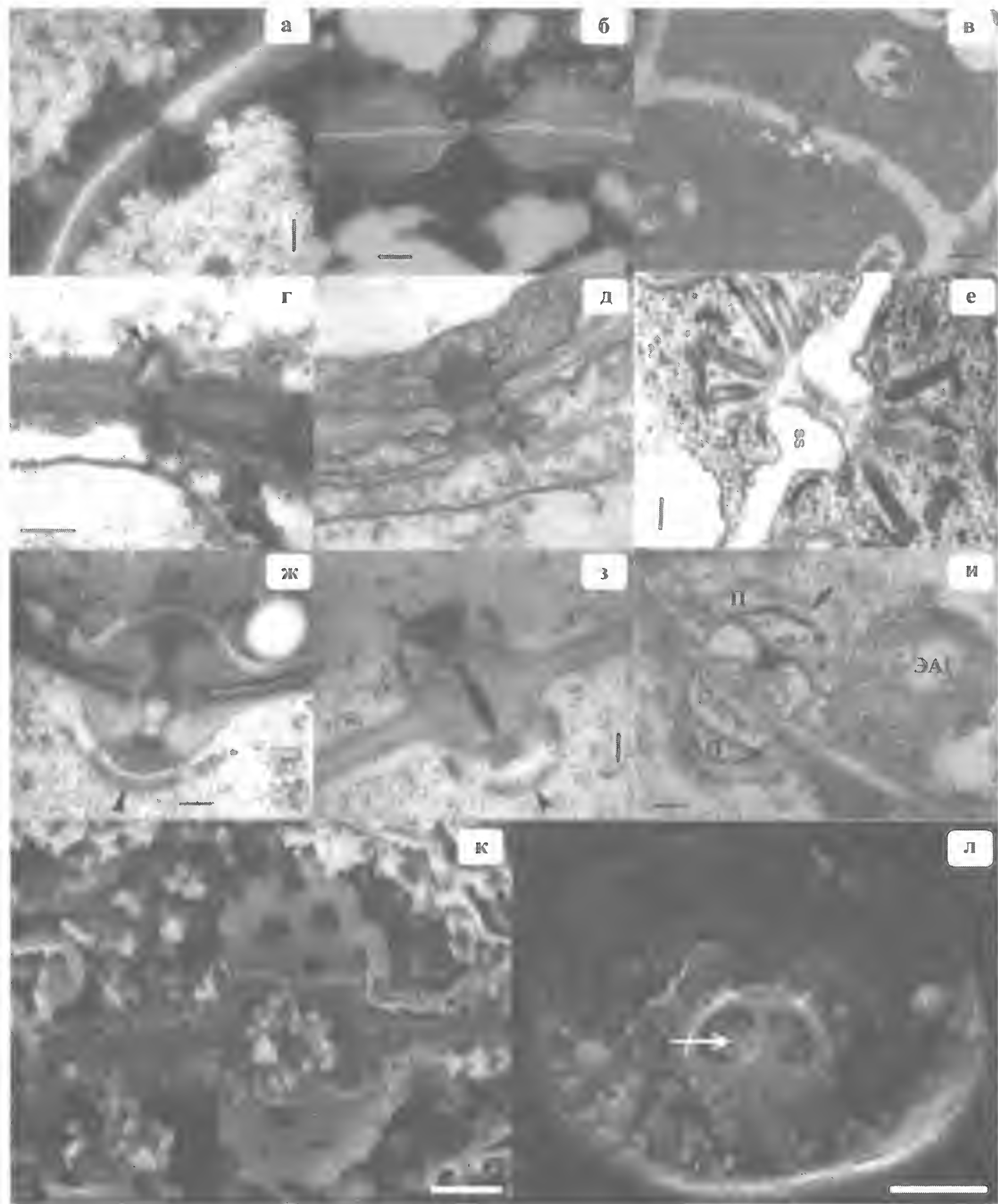


Рис. 18. Септальный аппарат у аско- и базидиомицетов.

а-б. Простые септы: а. *Cyrenella elegans* и б. *Septobasidium carestianum* без мембранных шапочек и парентосом, характерные для представителей класса Urediniomycetes. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

в. Септа *Podospora anserina* с тельцами Воронина (обозначены звездочкой), характерная для аскомицетов. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

Отдел Basidiomycota. В этом отделе различают три класса: Urediniomycetes, Ustilaginomycetes и Basidiomycetes. Каждый из перечисленных классов, среди других отличительных признаков, характеризуется специфичной ультраструктурой септы (рис. 18).

Класс Urediniomycetes или ржавчинные грибы имеют септы, сходные с мицелиальными из отдела Ascomycota, но без телец Воронина (рис.18а, б, табл. 3).

Класс Ustilaginomycetes или головневые грибы имеют простые септы, как у Urediniomycotina. Некоторые представители головневых грибов могут иметь небольшое утолщение вокруг поры (долипора, например, у представителей порядков Microstromatales, Tilletiales). Септальные поры могут быть связаны с мембранными шапочками или мембранными поясками (рис.18г, д).

Представители класса Basidiomycetes формируют базидии на специальных плодовых телах (базидиомах) разного облика и строения. Они имеют бочонкообразное утолщение вокруг поры, *долипору* (рис.18е–и), которая обычно ассоциирована с септальной поровой шапочкой или *парентосомой* (англ. septal pore cap, SPC). Долипора вокруг порового канала может изменять свое положение при прохождении цитоплазмы и органелл (рис. 19). Парентосома представляет собой многослойную структуру, у которой внутренняя и наружная мембраны образованы мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР, англ. ER). Парентосомы могут быть везикулярные, неперфорированные/сплошные и перфорированные.

Везикулярный тип (трубчатый или саккулярный) парентосом обнаружен у тремелловых грибов из пор. Tremellales и состоит из группы везикул или трубочек, окружающих долипору в виде полусферы (рис. 18е, табл. 3).

Неперфорированная парентосома обнаружена у представителей порядков Dacrymycetales и Auriculariales и состоит из немного приплюснутых закрытых мембранных структур (табл. 3). Этот тип парентосомы может иметь неравномерную толщину с уменьшением к центру или мельчайшую пору в центре мембраны. Неперфорированная парентосома имеет обычно ширину от 270 до 800 нм (рис.18ж).

Перфорированная парентосома обнаружена у ряда базидиальных грибов и может иметь много мелких перфораций подобно *Schizophyllum commune* (рис. 18з, к, 19) или несколько более крупных перфораций, как у *Rhizoctonia solani* (рис. 18л). Диаметр парентосомы *S. commune* составляет 450–600 нм с перфорациями размером 100 нм. Парентосома *R. solani* имеет диаметр 1600–2000 нм и содержит от 3 до 5 перфораций с диаметром 800 нм. Как правило, перфорации на апексе парентосомы крупнее, чем у ее основания.

Долипоровые септы, имеющие перфорированную парентосому, могут иметь дополнительную структуру, лежащую в непосредственной близости от нее — наружную шапочку. Шапочка

г. Простые поры с мембранными шапочками (стрелки) *Exobasidium pachysporum* и д. *Urocystis ranunculi*, характерные для представителей класса Ustilaginomycetes. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

е. Долипора *Tremella*. Медианный срез септального порового утолщения (SS), поры (P), и связанных с ними мешочков. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

ж. Долипоры с неперфорированной парентосомой (стрелки) *Dacrymyces stillatus*. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

з. Долипоры с перфорированной парентосомой (стрелки) *Schizophyllum commune*, характерные для представителей класса Basidiomycetes. Масштабный отрезок 0,1 мкм.

и. Наружная шапочка (стрелка) около парентосомы (П) *Agaricus bisporus*. Рядом с септой расположен эквивалент аппарата Гольджи (ЭАГ). Масштабный отрезок 0,1 мкм.

к. Перфорированная парентсома с маленькими перфорациями у *Schizophyllum commune* (Agaricomycetes). Масштабный отрезок 0,25 мкм.

л. Перфорированная парентосома с крупными перфорациями у *Rhizoctonia solani* (Agaricomycetes). Масштабный отрезок 1 мкм.

ТЭМ (а–и), СЭМ (к–л). Рис. а–б, г–д, ж–з по: Bauer et al., 2006, рис. в: О.А. Кудрявцева (ориг.), рис. е по: Berbee, Wells, 1988, рис к–л по: Müller et al, 1998.

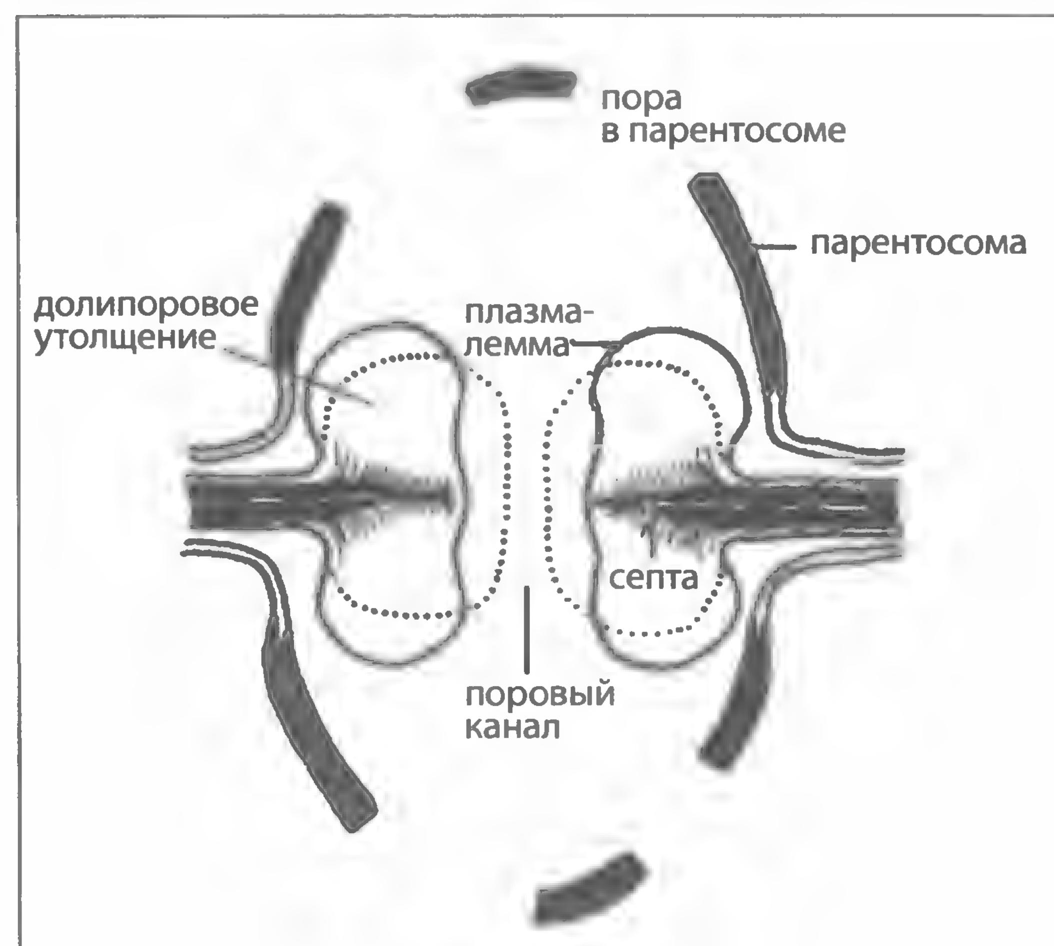


Рис. 19. Диаграмма продольного среза долипоры, показывающая нормальное положение (точковая линия) и модифицированное при течении протоплазмы (твердая линия) (Bracker, Butler, 1964).

встречается у агарикоидных грибов (*Agaricus bisporus*, *Coprinopsis cinerea* и *Agrocybe praecox*) и представлена цистерной ЭР, ассоциированной с перфорированной парентосомой (рис. 18и). Наличие или отсутствие наружной шапочки у перфорированной парентосомы зависит от стадии развития гифы.

Разные типы парентосом связаны в основании с ЭР. Это особенно четко видно у молодых гиф. У старых клеток ЭР в районе септы дегенерирует, и связь с ним теряется. Недалеко от места связи с ЭР лежит неперфорированная часть парентосомы. Детальное исследование строения парентосом у *S. commune* показало присутствие белка SPC33, локализованного внутри цистерны ЭР и обеспечивающего связь с цитоплазматическим белком SPC14. Так как основание парентосомы продолжается в ЭР, парентосомы можно рассматривать как *субдомен* этой органеллы. Это подтверждается локализацией флуоресцентных маркеров ЭР (ЭР-трекер, DIOC-6), которые окрашивают район локализации везикулярно-трубчатой парентосомы *Trichosporon sporotrichoides* и только внутреннюю и наружную мембраны перфорированной парентосомы *S. commune* и *R. solani*.

Долипоровый канал имеет диаметр 70–500 нм. Парентосомы вокруг долипоры ограничивают проход крупных органелл, таких как ядра. В определенных фазах жизненного цикла парентосомы растворяются, давая возможность миграции ядер. Подобно аскомицетам химический состав септы базидиомицетов отличается от латеральной клеточной стенки. Если латеральная клеточная стенка состоит из хитина, β-1,3/β-1,6-глюкана и α-1,3-глюкана, то септальная пластинка не содержит α-1,3-глюкан, за исключением септального вздутия, которое содержит α-1,3-глюкан, β-1,3-глюкан и β-1,6-глюкан. Более того, долипоровое вздутие содержит больше β-1,6-глюкана, чем септальная пластина. Среди долипоровых септ различаются несколько типов парентосом, которые могут служить филогенетическим маркером.

3.3. Функции септы и ассоциированных с ней структур

Поперечные перегородки механически укрепляют гифу. В этом случае септы действуют как структурная опора, обеспечивая дополнительные поперечные перегородки для такой трубковидной структуры как гифа.

Одновременно с этим септа осуществляет разделение гифы на клеточные компартменты. Септа может изолировать смежные компартменты один от другого, создавая возможность протекания разных биохимических и физиологических процессов, например, при формировании специализированных структур (спор) или возрастных изменениях мицелия.

У аскомицетов распределение органелл по компартментам, по-видимому, не контролируется и через пору в септе проходят ядра, митохондрии и другие органеллы. Однако у базидиомицетов с комплексной септой распространение клеточных компонентов при септировании не случайно. В отличие от аскомицетов, у некоторых базидиомицетов долипоровая септа с парентосомой препятствует свободной миграции крупных органелл, хотя

у ряда грибов наблюдали транспорт митохондрий (например, у фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*) и ядер через долипоровые септы. Долипоровая септа в процессе обмена ядрами при *дикариотизации* претерпевает реорганизацию/деградацию и превращается в простую септу, которая делает возможным транспорт ядер в ближайшую клетку. Деградация септы начинается с долипорового утолщения, которое прогрессивно деградирует до полного исчезновения. Процесс деградация септы ассоциирован с вторжением *везикул* и *мультивезикулярных тел,* содержащих литические ферменты, в район септы. Процесс деградации направлен от септальной поры к стенке гифы и продолжается до исчезновения септы. Парентосома может исчезать на разных этапах реорганизации септы. После завершения процесса обмена ядрами происходит синтез и восстановление структуры септы.

Септа может функционировать как сито для внутриклеточных органелл или блокировать их перемещение. Закрытие септы наблюдается в процессе гетерокариотической несовместимости и в процессе дифференциации мицелия (например, при формировании репродуктивных клеток). При слиянии гиф двух несовместимых штаммов четыре компартмента, граничащие с местом слияния септы блокируются. Слившаяся клетка затем лизируется путем апоптозоподобного процесса, в то время как смежные компартменты остаются интактными. Исследования функции закрытия септы на мутантных клетках в процессе развития показали, что мутации, нарушающие процесс формирования септы, препятствуют нормальному росту мицелия грибов.

Септа действует как первая линия обороны при повреждении гифы. Однопоровые септы с тельцами Воронина или белковыми кристаллами имеют преимущество, так как могут в течение нескольких секунд заблокировать пору и прервать поток цитоплазмы между смежными компартментами (рис. 20). В то же время у базидиомицетов и некоторых аскомицетов (*Podospora anserina*) присутствует другой механизм защиты мицелия, заключающийся также в быстрой блокировке поры в условиях стресса. В этом случае происходит очень быстрый синтез пробки, которая закупоривает вход в пору с каждой стороны септы поврежденного компартмента (рис. 20). На втором этапе пробка увеличивается в размере и заполняет долипоровый канал, то есть происходит дальнейшее «пломбирование» отверстия между смежными компартментами гифы. Материал «пломбы» может деградировать при обработке трипсином и химотрипсином, показывая, что он состоит, по крайней мере, частично из белка. Окрашивание полисахаридов дает различающиеся результаты. β-1,6-Глюкан не был определен в материале пробки *S. commune*, но

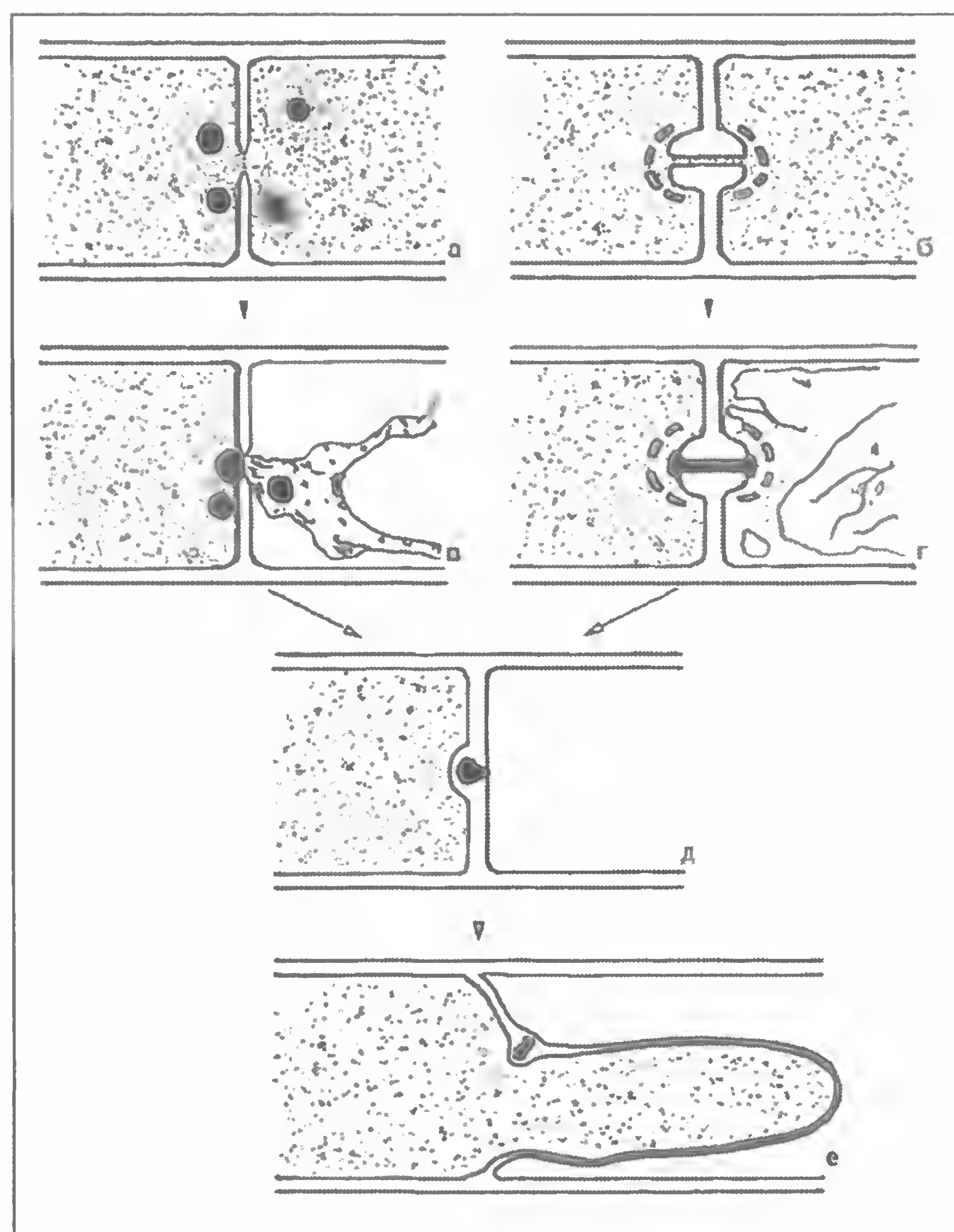


Рис. 20. Закупоривание септальной поры у аскомицетов и базидиомицетов.
(а) и (б) не закупоренные септы аскомицетов и базидиомицетов соответственно,
(в) закупоренная аскомицетовая пора тельцами Воронина,
(г) закупоривание базидиомицетовой поры электронно-плотным материалом, образующимся *de novo*,
(д) ремоделирование долипоры базидиомицетов и откладывание пробки с новым электронно-прозрачным материалом у аскомицетов,
(е) прорастание внутрь гифы через закупоренную септу (основано на фото *Penicillium chrysogenum*) (Markham, 1994).

был найден в пробках *Trichosporiella sporotrichoides*. Инициация ответа закупоривания наблюдается в смежных с поврежденным компартментом септах, причем этот процесс в молодых клетках гифы обратим. И долипора, и парентосома предположительно участвуют в закупоривании. Долипора может функционировать как акцептор материала пробки, в то время как парентосома может выступать в роли поставщика этого материала. Близость к септе парентосомы подтверждает эту точку зрения. Более того, были показаны нитчатые структуры между пробкой и парентосомой у *R. solani*, *Pisolithus arhizus* и *S. commune*. Они могут быть вовлечены в транспорт материала пробки от парентосомы к поре, функционируя как якорь, задерживающий пробку в ее положении или как опора для формирования пробки. Необходимо отметить, что представители Basidiomycota, которые не имеют парентосомы (Urediniomycetes, Ustilaginomycetes), также образуют пробки в септальной поре.

3.4. Септирование и цитокинез у грибов

Грибы проявляют одну из двух моделей роста: дрожжеподобную или мицелиальную. Дрожжеподобный рост, примером которого может быть рост дрожжей *S. cerevisiae*, характеризуется *полным цитокинезом* — процессом, который заключается в разделении дочерней клетки и материнской за счет частичной деградации хитин-содержащей *первичной* (см. далее) септы. Мицелиальные грибы обладают поляризованным ростом за счет деления апикальной клетки и формируют гифу, которая у большинства видов грибов (аскомицеты и базидиомицеты) разделена септами на компартменты. В септировании мицелиальных грибов и цитокинезе дрожжей участвуют гомологичные белки. Однако септа мицелиальных грибов не разделяет полностью цитоплазму смежных компартментов из-за наличия септальной поры (*неполный цитокинез* наблюдается у большинства грибов). В местах септирования у мицелиальных грибов не происходит гидролиза хитина и отделения дочерней клетки, что приводит к формированию многоклеточного мицелия.

Цитокинез и формирование септы — завершающие этапы клеточного цикла и поэтому нуждаются в тщательном генетическом контроле, также как и процессы роста, репликации ДНК и митоз.

Цитокинез приводит к физическому разделению материнской клетки на две, при этом подходы к делению клетки отличаются у разных модельных организмов (рис. 21).

У клеток растений работает древний механизм деления, связанный с формированием фрагмопласта и клеточной пластинки. У высших растений в заключительной стадии деления ядра в ранней телофазе формируется плотная структура *фрагмопласт*. Он состоит из идущих навстречу друг другу микротрубочек и актиновых филаментов, ориентироанных перпендикулярно продольной оси клетки. К фрагмопласту в медианной области доставляются везикулы, несущие материал клеточной стенки. В результате слияния этих везикул и формирования клеточной пластинки фрагмопласт постепенно вытесняется растущей поперечной перегородкой к периферии клетки. Вновь образовавшаяся клеточная пластинка сливается с материнской клеточной стенкой и разделяет клетку на две дочерние. Фрагмопласт к этому времени исчезает.

Дрожжи и клетки животных, в отличие от клеток растений, делятся с участием актомиозинового сократительного кольца, представляющего собой комплекс моторного белка миозина (2/3) и F-актина (1/3). У почкующихся дрожжей сократительное кольцо располагается в пространстве между материнской и дочерней клетками в перешейке. У делящихся дрожжей и клеток животных сократительное кольцо располагается центрально, так как оба типа клеток делятся медианной бороздой. Делящиеся и почкующиеся дрожжи синтезируют септу в пространстве за сократительным кольцом, которое постепенно деградирует, что приводит к физическому разделению клеток. У клеток животных распространение борозды деления сужает срединное веретено деления в плотную структуру, называемую «срединное тело» (midbody). Механизм цитокинеза через сократительное кольцо появился около миллиарда лет назад у общего предка амеб, грибов и животных.

Клеточное деление протекает в несколько этапов, причем каждый этап предполагает четкую генетическую регуляцию последовательного синтеза необходимых участников процесса. У грибов можно выделить четыре этапа. Все начинается с выбора места будущего деления (1). Далее происходит сборка белкового комплекса (2) и еще до окончания митоза формирование сократительного актомиозинового кольца (3) и, наконец, отложение хитина и других компонентов септы (4).

У грибов выявлено два механизма контроля цитокинеза, которые осуществляют связь митоза и цитокинеза. Один из них характерен для почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* с полным цитокинезом — сигнальный каскад реакций, который является триггером выхода из митоза и вхождения в процесс цитокинеза (митотическая цепь выхода, англ. mitotic exit network, MEN-путь). Другой механизм описан у делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* с полным цитокинезом и мицелиальных грибов (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*) с неполным цитокинезом запускается в конце анафазы митоза. Он заключается в сокращении актомиозинового кольца, инвагинации цитоплазматической мембраны и синтезе септы (система инициации септирования, англ. septation initiation network, SIN-путь).

Синтез хитина имеет место в обоих случаях. У почкующихся дрожжей отделение дочерней клетки от материнской происходит после лизиса хитина первичной септы. А у мицелиальных грибов септа остается интактной и связь между апикальным и субапикальными фрагментами сохраняется, благодаря наличию пор. Разделение материнской клетки на две (цитокинез) путем формирования септы (септирование) у животных, растений и мицелиальных грибов предполагает взаимозаменяемость/тождество терминов цитокинез = септирование. У одноклеточных грибов септирование не тождественно цитокинезу.

Эти особенности протекания цитокинеза и септирования у грибов открыли возможность использования грибов для понимания механизмов клеточного деления у других эукариотических организмов.

Рассмотрим этапы клеточного деления у грибов.

3.4.1. Выбор места септирования

Временная и пространственная регуляция положения плоскости деления отличается у почкующихся, делящихся дрожжей, мицелиальных грибов, животных и растений.

Грибы используют, по крайней мере, три разных механизма выбора места септирования. У почкующихся дрожжей плоскость деления определяется в позднюю G_1 фазу и находится по соседству с местом предыдущего деления (тип А). У делящихся дрожжей место деления определяется в стадию G_2 и отражает положение интерфазного ядра (тип Б). У мицелиального гриба *A. nidulans* положение септы зависит от стадии развития и дифференциации клетки: ростковая трубка, клетки гифы или репродуктивные клетки, вовлеченные в процесс конидиеобразования (тип В). У клеток животных и растений плоскость деления определяется положением веретена в анафазу. Рассмотрим подробнее механизмы выбора места септирования.

Понимание молекулярных механизмов выбора места септы у мицелиальных грибов имеет центральное значение в понимании биологии грибов. Показано, что район кончика гифы, а также места септирования образуют обогащенные стерином домены, называемые липидным мостом, который может играть ключевую роль в запуске сборки белковой машины септирования. В последнее время обсуждается роль кончика гифы в формировании сигнала для септирования.

3.4.1.1. Выбор места септирования у дрожжей

Почкование *S. cerevisiae* (рис. 22А) происходит в начале нового клеточного цикла перед удвоением ДНК до формирования веретена деления. Этот процесс определяет положение новой почки и требует корректной ориентации веретена деления будущей почки по отношению к материнской клетке.

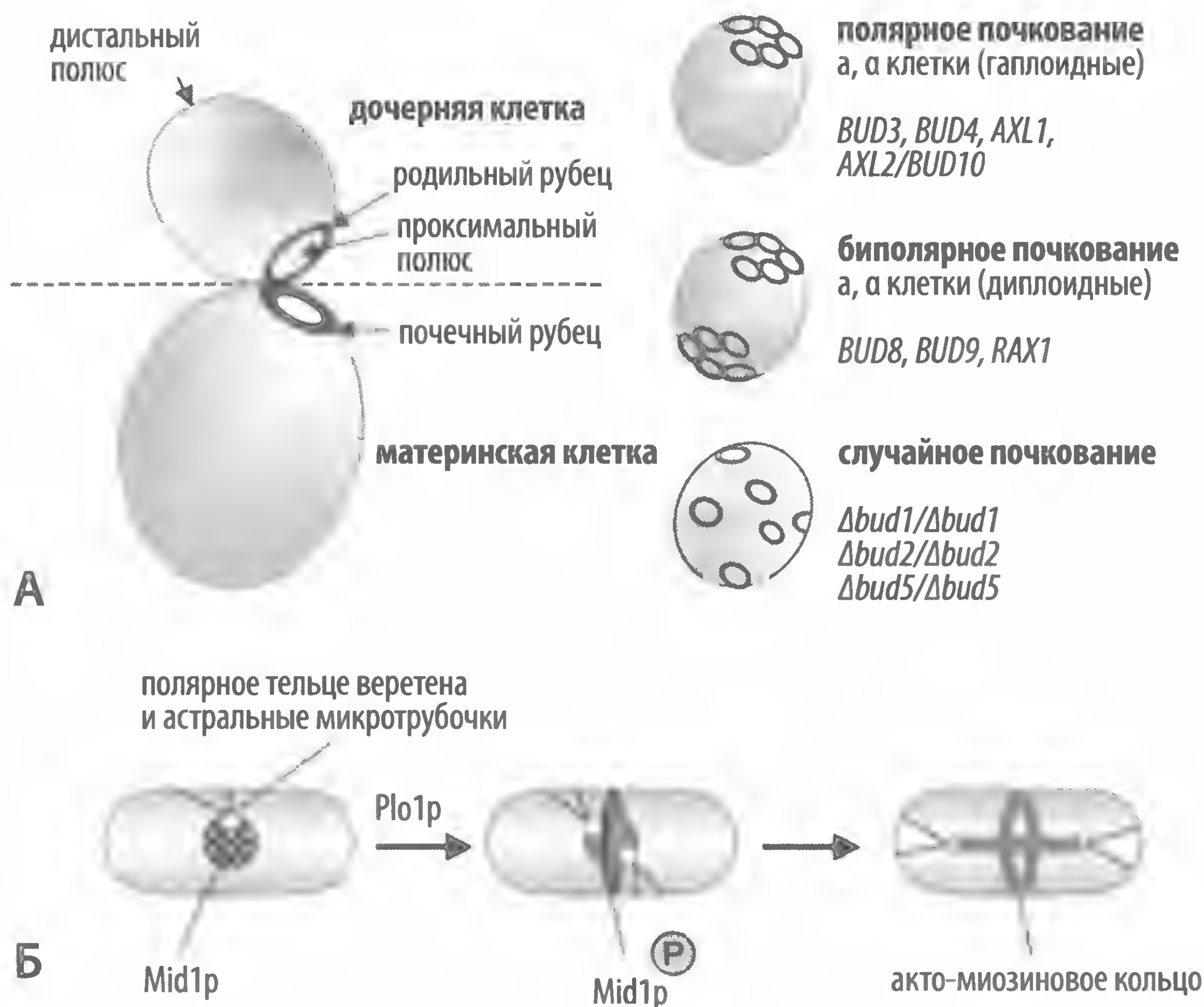


Рис. 22. Выбор места деления.
А. У *Saccharomyces cerevisiae* имеется два типа формирования почки и соответственно положения плоскости деления, что объясняет положение почечных рубцов. Осевое почкование гаплоидных клеток a или α приводит к образованию рядов почечных рубцов на проксимальном полюсе клетки, в то же время диплоидные клетки (a/α) используют оба полюса для почкования Новый рубец у гаплоидных клеток расположен по соседству с рубцом предыдущего клеточного цикла, и основан этот механизм на экспрессии маркерных белков, специфичных для гаплоидных клеток В каждом случае представлен список значимых для почкования белков. Отсутствие *BUD1*, *BUD2*, или *BUD5* приводит к потере информации о положении почек и случайному почкованию.
Б. У *Schizosaccharomyces pombe* выбор плоскости деления зависит от положения белка Mid1p. Mid1p локализован в ядре; его фосфорилирование, выход в цитоплазму и накопление в кортексе клетки в месте локализации ядра служат маркером к сборке белкового комплекса для септирования то есть акто-миозинового кольца (Walther, Wendland, 2006).

Ось почкования у гаплоидных дрожжей (a или α тип клеток) ограничена выбором места почкования на *проксимальном* полюсе клетки, на котором дочерняя клетка будет связана с материнской клеткой (рис. 22А). При биполярном почковании диплоидных клеток (a/α тип) почки формируются на обоих концах материнской клетки. Выбор места почкования регулируется маркерными белками, локализованными в клеточной оболочке. Гены *Bud3*, *Bud4*, *Axl1* и *Bud10/Axl2* кодируют специфические маркерные белки, инициирующие выбор места почкования у гаплоидных клеток. Единичная делеция генов, определяющих осевое почкование, приводит к биполярному почкованию у гаплоидных клеток. Значимыми белками для биполярного почкования являются Bud8, Bud9 и Rax1. Ген *Bud8* кодирует белок, локализованный на дистальном конце клетки, а *Bud9* — на проксимальном. Таким образом, два разных белка определяют противоположные полюса почкования и септирования. Делеция по одному из генов приводит к однополюсному почкованию. При делеции гена *Bud8* почкование происходит на проксимальном конце, а гена *Bud9* — на дистальном. Белки Bud8 и Bud9 обладают высоким сходством (результат удвоения и дивергенции генов). Rax1p белок необходим для

создания биполярности почкования и для локализации Bud8.Плоскость деления и положение септы у *S. pombe* определяется, как и у клеток животных, положением интерфазного ядра, что сделало *S. pombe* моделью для изучения процессов деления клетки. Следует отметить, что у клеток животных выбор плоскости деления помимо положения ядра перед делением определяется формированием микротрубочкового веретена деления, образующего структуру под названием «срединное тело» или остаточное тело Флеминга. Данная особенность может быть связана с тем, что у клеток животных митоз открытый, а у большинства грибов, в том числе и дрожжей, — закрытый. У *S. pombe* местоположение ядра перед делением определяет место септирования. Белок Mid1 (также известный как Dmf1) играет особую роль в определении положения плоскости деления. Мутанты *mid1* способны к формированию актинового кольца, но положение его случайно. Mid1p локализован в ядре интерфазных клеток, он выходит из ядра при фосфорилировании в процессе митоза и регулируется через киназу Plo1 (рис. 22Б). У дрозофилы и клеток человека обнаружены гомологи Mid1p (аниллин-подобный белок, связывающий актин) и продемонстрированы аналогичные *S. pombe* образцы локализации плоскости деления. Таким образом, выбор плоскости деления у *S. pombe* основан на консервативных молекулярных механизмах, свойственных и клеткам животных.

3.4.1.2. Септирование мицелиальных грибов (рис. 23)

Септы у грибов образуются достаточно быстро в течение нескольких минут: 2 мин (*Alternaria solani*), 4 мин (*N. crassa*), 10 мин (*R. solani*) и 20 мин (*Rhizopus nigricans*).

У мицелиальных грибов, таких как *N. crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Ashbya gossypii*, поиск белков-аналогов дрожжевым Bud и Mid1p белкам выявил белки с высоким уровнем сходства с белками Bud, но не Mid1p. Основной механизм выбора места септирования консервативен у мицелиальных аскомицетов, однако зависит от типа клеток и разных стадий развития специализированных клеток. Так, например, у *A. nidulans* и *A. gossypii* проросшие споры образуют округлые ростковые гифы (рис. 23А). Споры прорастают по способу биполярного роста, характерному для диплоидных клеток *S. cerevisiae*. Первый этап септирования у указанных выше видов грибов проходит в перешейке между спорой и ростковой гифой.

Индукция формирования гифы у *Candida albicans* приводит к образованию ростковой трубки вне дрожжевой клет-

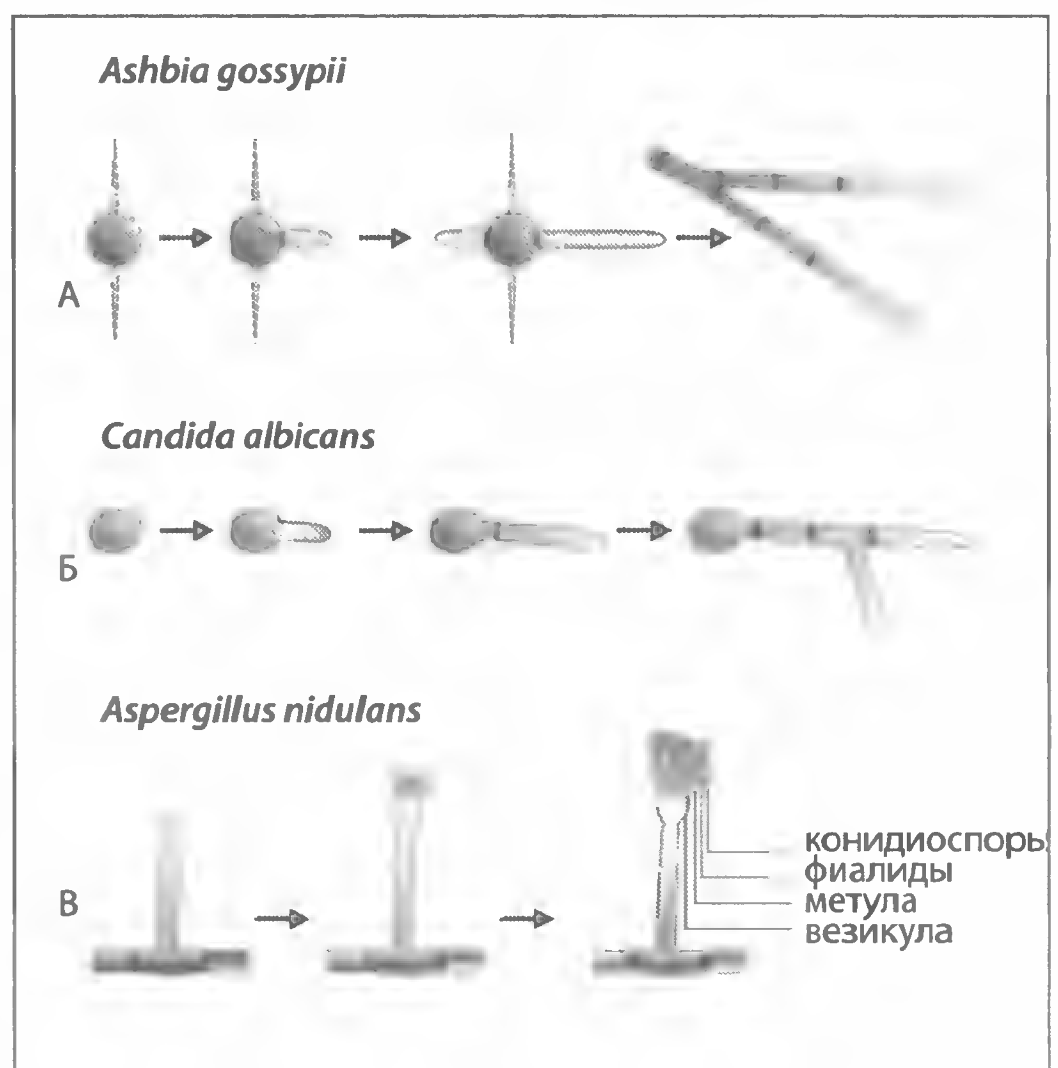


Рис. 23. Образцы септирования у мицелиальных грибов.

А. Прорастание споры *Ashbya gossypii* приводит к формированию ростковой трубки. Наблюдаемое биполярное прорастание дает начало двум гифам. Септа находится в перешейке между прорастающей клеткой и гифой. Гифа компартментализуется путем септирования, которое происходит через регулярные интервалы. Зрелый мицелий *A. gossypii* имеет характерное дихотомическое ветвление, что видно по одновременному образованию септы в основании ветвления.

Б. Индукция формирования гифы *Candida albicans* приводит к образованию ростковой трубки вне дрожжевой клетки. Положение первой септы специфическое, так как оно находится на расстоянии 10–15 мкм от места соединения материнской клетки и ростковой трубки.

В. *Aspergillus nidulans* образует специализированные типы клеток в процессе конидиогенеза. Метулы, фиалиды и конидиоспоры — одноядерные, метулы и фиалиды показывают однополюсное почкование (Walther, Wendland, 2006).

ки. Положение первой септы специфическое, оно определяется положением септинового кольца и находится не в месте соединения материнской клетки и ростковой трубки, а на расстоянии 10–15 мкм вглубь ростковой трубки (рис. 23Б). Такое специфичное для гифы положение септинов обеспечивает мицелиальный рост *C. albicans*.

В процессе конидиогенеза *A. nidulans* происходит переключение с изотропного роста на поляризованный и обратно и наблюдается специфическое положение септы (рис. 23С). Гифа гриба дифференцируется в конидиеносец, расширенный на конце, от которого берут начало одноядерные клетки: метулы, фиалиды и цепочка конидий, сходные с гаплоидными дрожжевыми клетками, имеющими однополюсный способ почкования.

3.4.2. Формирование белкового комплекса, актомиозинового кольца и септы у разных модельных видов грибов

У почкующихся дрожжей получены доказательства, что в процессе цитокинеза происходит образование мембраны в местах деления, но молекулярный механизм, ответственный за этот процесс, непонятен. Большое количество соединений, связанных с экзоцитозом, мигрируют из верхушки почки в перешеек в позднюю анафазу как раз перед цитокинезом. Они включают: миозин Myo2p типа V и ассоциированную с ним миозиновую легкую цепь Mlc1p, которые участвуют в транспорте везикул; мультикомплекс экзоцисты и ее регулятора Rab ГТФаза Sec4p; а также регуляторы сборки актинового цитоскелета, такие как Cdc42p и Rho1p. Так как Cdc42p и Rho1p регулируют сборку актина и секрецию, эти белки, связанные с ГТФ, могут согласованно регулировать сокращение актомиозинового кольца и целевое отложение компонентов мембраны в процессе цитокинеза.

После выбора места клеточного деления происходит цепочка взаимосвязанных и взаимозависимых событий, заканчивающаяся цитокинезом и формированием септы между двумя дочерними клетками (цитокинез и септирование) у мицелиальных грибов или цитокинезом у дрожжей. Рассматривать отдельно этапы единой цепи событий не имеет смысла. В процессе эволюции белковый комплекс, формирующийся при септировании (представлен семейством митотических белков *септинов*), и актомиозиновое кольцо оказались высоко консервативными у грибов и животных.

У почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 24) сигнальный каскад MEN начинается с белка Cdc42p, связанного с ГТФ, и далее через эффекторные белки Cla4p и Bni1p приводит к формированию септинового кольца. Сборка актомиозинового кольца происходит с участием белка, родственного белкам семейства IQGAP (IQGAPs — семейство каркасных белков, имеющих множество доменов и названное по имени мотива IQ и домена белка GAP, активируемого ГТФазой), Cyk1p/Iqg1p. Белок Bud3 и другие белки также задействованы в формировании сократительного кольца в перешейке почки. Первоначально формируется одно септиновое кольцо. В процессе фазы инициации и каскада реакций MEN кольцо расщепляется на два септиновых кольца и два кольца Bud3, в то время как актомиозиновое кольцо начинает сокращаться. Хитинсинтазы Chs2p и Chs3p, локализованные в плазмалемме в районе септинового кольца, принимают участие в синтезе септы. Вначале между материнской и дочерней (почка) клетками *S. cerevisiae* формируется *первичная* хитиновая септа при участии Chs2p, далее откладывается *вторичная* хитинглюкановая септа при участии Chs3p и глюкансинтазы, а первичная лизируется хитиназой. От нее остается почечный рубец в виде кольца из хитина на материнской клетке. Каталитическая субъединица хитинсинтазы II Chs2p локализуется в перешейке в позднюю анафазу. Делеция *Chs2* не летальна, но вызывает серьезные дефекты цитокинеза: актомиозиновые кольца могут формироваться, но не способны к сокращению или оно неэффективно. Каталитическая субъединица хитинсинтазы III Chs3p, ответственная за синтез ~90% клеточного хитина, выявляется рано в клеточном цикле в основании почки, но изменяет локализацию в позднюю анафазу и обнаруживается в перешейке. Делеции *Chs2* и *Chs3* летальны. Локализация Chs2p и

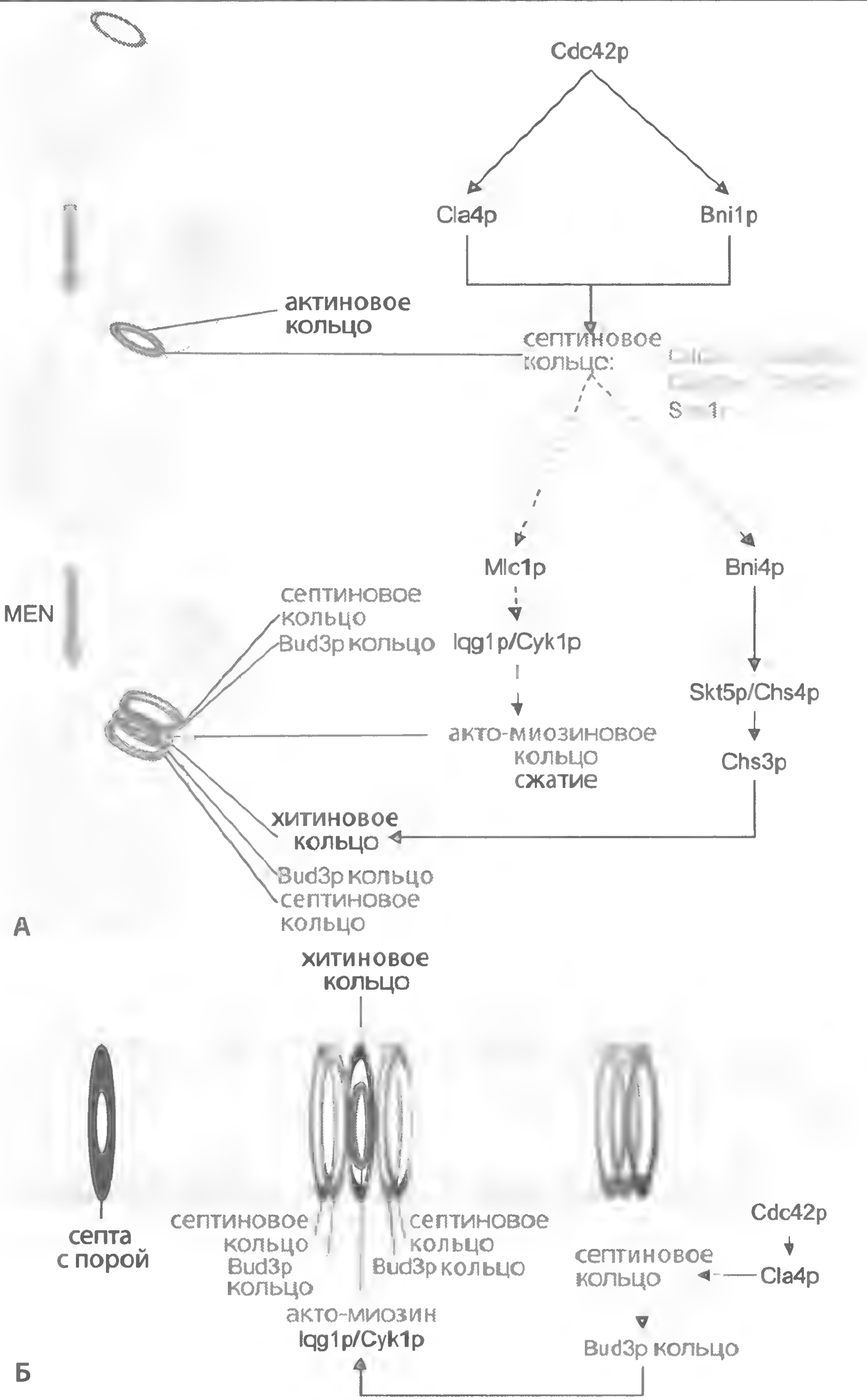


Рис. 24. Сборка белкового комплекса в процессе септирования/цитокинеза.
А. У почкующихся дрожжей сигнальный каскад реакций (показан справа) от Cdc42p передается через эффекторные белки Cla4p и Bni1p и приводит к формированию септинового кольца (дрожжевая клетка слева схематично представляет течение процесса). Сборка акто-миозинового кольца вовлекает IQGAP-родственный белок Cyk1p/Iqg1p. Bud3 и другие белки также задействованы в формировании септинового кольца в перешейке почки. Первоначально формируется одно кольцо. В процессе фазы инициации выхода из митоза (MEN-пути), кольцо расщепляется на септин и Bud3 кольца, в то время как акто-миозиновое кольцо сжимается. Хитинсинтазы Chs2p и Chs3p, локализованные около септинового кольца принимают участие в формировании первичной (при участии Chs2p), а также вторичной (при участии Chs3p) септы.
Б. На примере гифы у *Ashbya gossypii* можно наблюдать разные стадии септирования, пространственно распределенные по гифе. Близко к кончику гифы формируются одно кольцо Bud3p и акто-миозиновое кольцо. Динамику событий можно увидеть на примере субапикальной септы, показывающей расщепление септинового кольца и сокращение акто-миозинового кольца, в то время как белковый комплекс у мест септирования в будущем субапикальном районе разобран на части (Walther, Wendland, 2006).

Chs3p в перешейке зависит от *септинов*. Таким образом, септины играют роль в направлении секреции хитина к месту формирования септы, что свидетельствует о взаимной связи между актомиозиновым кольцом и отложением материала септы. Сокращение актомиозинового кольца запускает механизм синтеза мембраны, поэтому образование септы происходит в нужном месте. И наоборот, синтез септы модулирует сокращение актомиозинового кольца.

У делящихся дрожжей *S. pombe* белок Mid1/Dmf1 играет особую роль в положении плоскости деления. Белок Mid1p локализован в ядре интерфазных клеток и выходит из ядра при фосфорилировании в процессе митоза (рис. 22Б). Разделение полярных тел веретена (ПТВ, англ. spindle pole body, SPB) происходит через 60 мин после того, как около плазматической мембраны закладываются интерфазные узелки, содержащие аниллин-подобный белок Mid1 и киназы клеточного цикла. Узелки расположены по экватору клетки и микротрубочки толкают ядро к ее центру. За 10 мин до разделения ПТВ происходит созревание интерфазных узелков в цитокинетические узелки с добавлением миозина II (Myo2), сборного белка rng2 (член семейства белков IQGAP), F-BAR домен-содержащего белка, контролирующего клеточное деление белка cdc15 и формина cdc12. В процессе анафазы А (за 5 мин) происходит взаимодействие миозина II с филаментами актина и конденсация узелков в сократительное кольцо, которое созревает путем добавления большого количества cdc15, закупоривающего белка, нетрадиционного миозина II (Myp2; также известного как Myo3) и других белков. В анафазу В (от 10 до 30 мин) митотическое веретено вытягивается и аниллин-подобный белок Mid2 и септины образуют двойные кольца, смежные с сократительным кольцом. Белок Mid1 вытесняется при сокращении. В конце анафазы сигнальный путь состоит из ГТФазы и трех киназ SIN, запускающих сжатие кольца (занимает около 40 мин), инвагинацию мембраны и синтез новой клеточной стенки для формирования септы. Конец сжатия наблюдается через 70 мин после расхождения ПТВ. Еще через 30 мин происходит разделение клеток септой.

SIN-путь у *S. pombe* имеет три центральные каскадные киназы: Cdc7p, Sid1p и Sid2p. Активация происходит при участии маленького G-белка Spg1p, связанного с ГТФ, далее следует киназный каскад SIN, который инициирует сокращение актомиозинового кольца после завершения митоза.

Секреция новых мембран и сборка септы у делящихся дрожжей происходят параллельно с сокращением актомиозинового кольца. Отложение компонентов септы непосредственно регулирует скорость сокращения актомиозинового кольца, так как это сокращение блокируется ингибитором транспорта везикул брефельдином А или мутациями ферментов, важных для синтеза септы. В отличие от животных у делящихся дрожжей участие микротрубочек в сборке новых мембран и септы не обязательно. Секреция к месту деления интегрального мембранного белка, необходимого для сборки клеточной стенки, Cps1p (1,3-β-глюкансинтаза) и стеринов мембран происходит независимым от F-актина образом, хотя F-актин требуется для сборки этих компонентов.

Очевидно, что белки, участвующие в экзоцитозе, такие как компоненты экзоцисты, трансмембранные белки, родственные синтаксину, Rab ГТФазы и белки, важные для сборки клеточной стенки, Mok1p и Cps1p (1,3-α-глюкансинтаза и 1,3-β-глюкансинтаза, соответственно), принимают участие в цитокинезе. Стерины мембран также приурочены к месту деления, где они могут участвовать в заякоривании актомиозина или регулировать доставку компонентов мембраны и сборку клеточной стенки.

Для регулярного септирования и конидиообразования у мицелиального гриба *A. nidulans* необходимо присутствие следующих белков: биспирального белка SNAD, связанного с ПТВ, и белка SEPK. Было показано, что белки SNAD и SEPK действуют как опорные белки, которые требуются для локализации белков SIN-пути, SIDB и MOBA, около ПТВ. При отсутствии белков SEPK или SNAD, SIDB/MOBA успешно локализуются около места септирования, показывая, что их ранняя локализация у ПТВ не существенна для позднего появления в месте деления. В отличие от их функциональных двойников у делящихся дрожжей белки SEPK и SNAD не требуются для вегетативного роста, а необходимы только для регулярного септирования. Было сделано заключение, что локализация компонентов SIN около ПТВ не обязательна для септирования как такового, но имеет критическое значение для регулярности септирования у *A. nidulans*.

Формирование септы у *A. nidulans* происходит после трех последовательных митозов в процессе прорастания конидии (рис. 25). Триггером цитокинеза/септирования у *A. nidulans* является сигнальный каскад реакций SIN, в отличие от MEN *S cerevisiae*. Сигнальный каскад SIN впервые проявляется около ПТВ в процессе митоза и представляет собой каскад реакций с участием трех протеинкиназ, которые активируются маленькой ГТФазой. Формин SepA/SEPA (формины — белки, принимающие участие в зарождении нитей F-актина) локализуется в виде кортикальной метки в месте будущей септы. Далее он связывается с септином AspB и актином для формирования септального пояса. Локализация септина AspB и формина SepA в месте септирования требует участия SepH. В заключение митоза формин образует одно кольцо рядом с актомиозиновым кольцом в месте септирования. Одновременно с сокращением актомиозинового кольца происходит синтез хитина на участке инвагинации. А кольцо септина AspB разделяется на два кольца, которые располагаются по бокам септы. Далее кольцо, располагающееся с апикальной стороны септы, сохраняется, а с базальной исчезает, специфически маркируя апикальную сторону септы (или базальный конец новой клетки гифы). AspB определяет свойственную гифе *A. nidulans* полярность. Так же как септины *S. cerevisiae*, септины *A. nidulans* могут быть морфологическими маркерами или регуляторами клеточного цикла. Асимметрия в локализации AspB демонстрирует, что множественное септирование распространяется парасинхронно в виде волны от апекса к базальному району гифы. Актомиозиновое кольцо сохраняется в процессе митоза вплоть до разделения ядер и возвращения в интерфазу. Актин становится менее заметным, отделяется от развивающейся септы и постепенно исчезает, покидая новую септу. Синтез хитина происходит при участии связанных с цитоплазматической мембраной ферментов (см. главу «Клеточная стенка»)

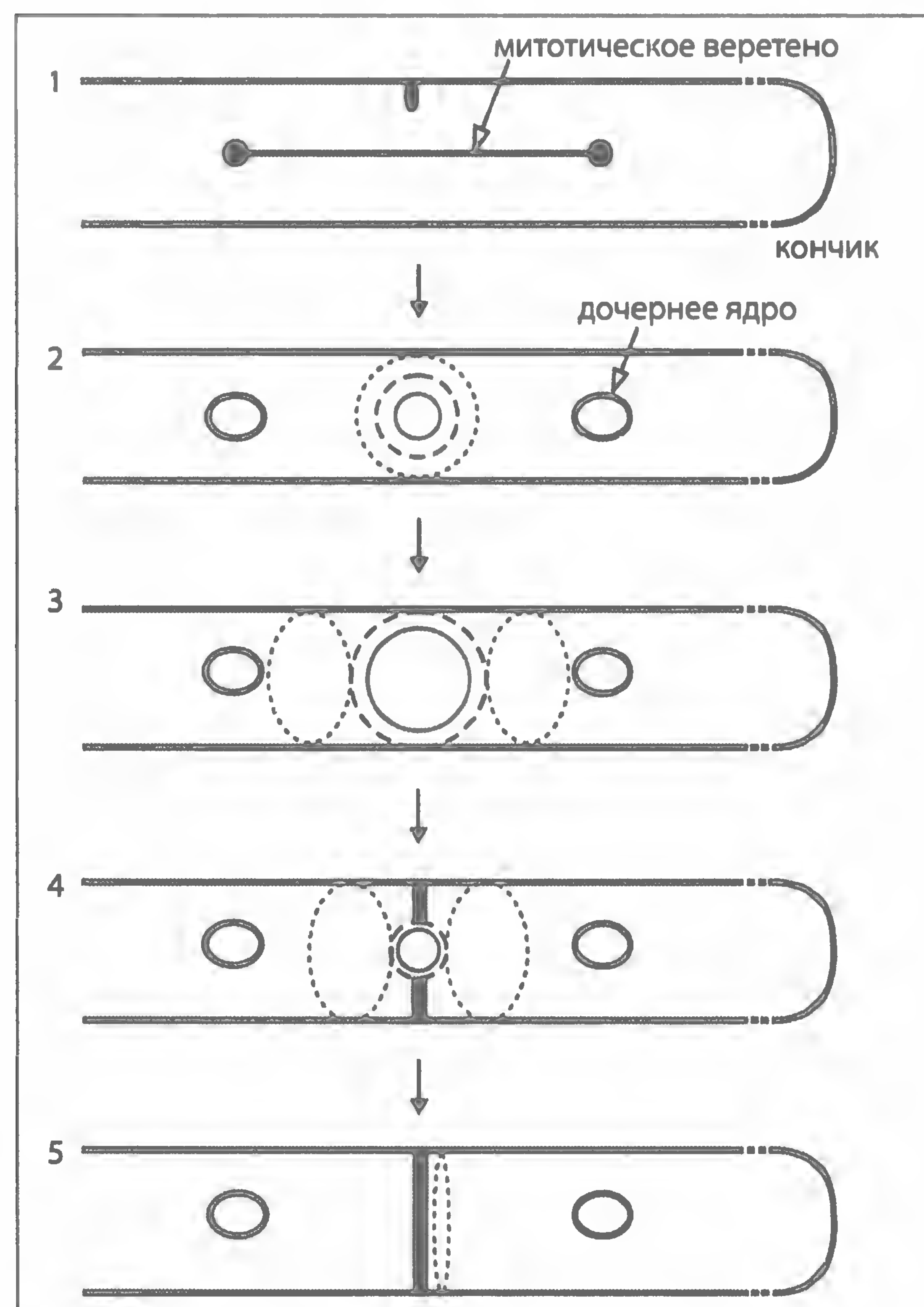


Рис. 25. Модель сборки и динамики септальной пластины у *Aspergillus nidulans*.
1. В ответ на сигналы от митотического веретена происходит локализация септина SepA в месте септирования в виде кортикальной метки (овал). Возможно, маленькие частицы актина и/или AspB ко-локализованы с септином SepA.
2. Сборка септальной ленты, которая состоит из ко-локализованных актинового (пунктирная линия), AspB (точечная линия) и септин SepA (сплошная линия) колец. Дочерние ядра находятся в стадии выхода из митоза.
3. Кольцо AspB делится на два кольца, которые располагаются сбоку от актинового кольца и кольца SepA. Как это было предложено у *S. cerevisiae*, разделение септинового (AspB) кольца может быть триггером сокращения актинового кольца.
4. Актиновое и SepA кольца сокращаются, в то же время откладывается материал септы (светло-серый).
5. По завершению формирования септы кольца актина, SepA и расположенный с базальной стороны септы AspB исчезают, в то время как с апикальной стороны AspB сохраняется (Harris, 2001).

Формирование септы у мицелиальных грибов имеет место в прорастающих спорах, между компартментами гифы в процессе роста и ветвления, формирования пряжек и при конидиогенезе.

Процесс образования септы у некоторых базидиомицетов изучен пока только на структурном уровне. Продемонстрировано, что септа развивается на месте локализации ядра перед делением, как и у мицелиальных аскомицетов.

3.4.3. Образование долипоровой септы и парентосомы

Результаты наблюдений с помощью световой и электронной микроскопии показали, что долипора формируется в процессе синтеза базидиомицетной септы. После того как септа достигнет окончательного размера, ее наружный слой сильно разрастается в районе поры и расширяется за счет отложения глюкана (α-1,3-глюкан, β-1,3-глюкан и β-1,6-глюкан), формируя долипоровое утолщение. Немногое известно о формировании парентосомы. Основываясь на данных электронной микроскопии, была предложена модель синтеза этой структуры. В этой модели цистерны ЭР выстраиваются параллельно септе и агрегируют в структуру неопределенного размера. Эта структура затем развивается в две парентосомы, которые остаются привязанными к септе в процессе роста и занимают положение около долипоровой септы Положение парентосомы около септы, по общему мнению, имеет место на финальной стадии процесса формирования септы.

Формирование септы по данным, полученным с помощью электронной микроскопии, на примере *Auricularia auricular-judae* происходит следующим образом. После инициации септирования происходит инвагинация плазмалеммы с небольшим количеством материала стенки. Около септы наблюдаются микровезикулы, предположительно содержащие предшественники материала септы, *хитосомы* и промежуточные филаменты (см. главу «Цитоскелет»). Они окружают и/или прикрепляются к врастающей внутрь центрипетально септе. Хитосомы собираются вокруг ободка врастающей септы, хотя встречаются и по всей ее длине. Филаменты с диаметром 10,6–13,2 нм ориентированы параллельно и перпендикулярно формирующейся септе. В непосредственной близости от формирующейся септы локализован эквивалент Гольджи (центр формирования микровезикул) в виде прерывистых цистерн, обычно расплющенных и ассоциированных с микровезикулами.

Таким образом, можно видеть, что гифы грибов формируют разнообразные септальные структуры, которые обеспечивают мицелий дополнительной механической защитой, продолжительным ростом и функционированием. Септирование и цитокинез у грибов имеют свои особенности: не всегда формирование септы связано с ядерным делением, наличие двух типов цитокинеза: полный и неполный. По механизму цитокинеза с образованием актомиозинового сократительного кольца грибы ближе к животным, нежели растениям.

Литература

Balasubramania M.K., Bi E., Glotzer M. 2004. Comparative analysis of cytokinesis reviewin budding yeast, fission yeast and animal cells. Review // Current Biology. Vol.14. No.18. R806–R818.

Bauer R., Begerow D., Sampaio J.P., Weiß M., Oberwinkler F. 2006. The simple-septate basidiomycetes: a synopsis // Mycol. Progress. Vol.5. No1. P.41–66.

Berbee M.L., Wells K. 1988. Ultrastructural features of mitosis and the septal pore apparatus in *Tremella globospora* // Mycologia. Vol.80. P.479–492.

Berepiki A., Lichius A., Read N.D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi // Nature Reviews Microbiology. Vol.9. P.876–887.

Bracker, C.E., Butler E.E. 1964. Function of the septal pore apparatus in *Rhizoctonia solani* during protoplasmic streaming.// J. Cell Biol. Vol.21. P.152–157.

Celio G.J., Padamsee M., Dentinger B.T.M., Bauer R., McLaughlin D.J. 2006. Assembling the fungal tree of life: constructing the structural and biochemical database // Mycologia. Vol.98. No.6. P.850–859.

Freitag J., Lanver D., Böhmer C., Schink K.O., Bölker M., Sandrock B. 2011. Septation of Infectious Hyphae Is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* // PLoS Pathogens. Vol.7. No.5. P.1–15.

Guertin D.A., Trautmann S., McCollum D. 2002. Cytokinesis in Eukaryotes // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol.66. No.2. P.155–178.

Harris S.D. 2001. Septum formation in *Aspergillus nidulans* // Current Opinion in Microbiology. Vol.4. P.736–739.

Hayakawa Y., Ishikawa E., Shojl J-y., Nakano H., Kitamoto K. 2011. Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* // Molecular Microbiology. Vol.1. P.40–55.

Kim J. M., Lu L., Shao R., Chin J., Liu B. 2006. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans* // Genetics. Vol.173. P.685–696.

Kim J.M., Zeng C.J.T., Nayak T., Shao R., Huang A-C., Oakley B.R., Liu B. 2009. Timely septation requires SNAD-dependent spindle pole body localization of the septation initiation network components in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // Molecular Biology of the Cell. Vol.20. No.15. P.2874–2884.

Lu H., McLaughlin D.J. 1991. Ultrastructure of the septal pore apparatus and early septum initiation in *Auricularia auricular-judae* // Mycologia. Vol.83. No.3: P.322–334.

Lutzoni F.O., Kauff F., Cox C.J. McLaughlin D., Celio G.J., Dentinger B.T.M., Padamsee M., Hibbett D., James T.Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofctetter V., Schoch C., A. Arnold A.E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G-H, Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R.C., Hosaka K., Lim Y.-W., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification and evolution of subcellular traits // American Journal of Botany. Vol.91. No.10: P.1446–1480.

Markham P. 1994. Occlusions of septal pores in filamentous fungi. Review // Mycological Research. Vol.98. No.10. P.1089–1106.

Momany M., Hamer J.E. 1997. Relationship of actin, microtubules, and crosswall synthesis during septation in *Aspergillus nidulans* // Cell Motility and the Cytoskeleton. Vol.38. P.373–384.

Müller W.H., Montijn R.C., Humbel B.M., van Aelst A.C., Boon E.J.M.C., van der Krift T.P., Boekhout T. 1998. Structural differences between two types of basidiomycete septal pore caps // Microbiology. Vol.144. P.1721–1730.

van Peer A.F. 2008. [Structure and function of the septal pore cap of *Schizophyllum commune*]. [Dissertation (PhD)]. The Netherlands. University of Utrecht: Utrecht. 120 p.

van Peer A.F., Wang F., van Driel K.G., de Jong J.F., van Donselaar E.G., Müller W.H., Boekhout T, Lugones L.G., Wösten H.A. 2010. The septal pore cap is an organelle that functions in vegetative growth and mushroom formation of the wood-rot fungus *Schizophyllum commune* // Environ Microbiol. Vol.12. No.4. P.833–44.

Pollard T.D., Wu J-Q. 2010. Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast // Nature reviews Molecular cell Biology. Vol.11. P.149–155.

Roh D.-H., Bowers B., Schmidt M., Cabib E. 2002.The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast // Mol. Biol. Cell. Vol.13. No.8. P.2747–2759.

Si H., Justa-Schuch D., Seiler S., Harris S.D. 2010. Regulation of septum formation by the Bud3-Rho4 GTPase module in *Aspergillus nidulans* // Genetics. Vol.185. No.1. P.165–176.

Walther A., Wendland J. 2006. [Septation and cytokinesis in fungi] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P.105–121.

Глава 4.
Апикальный рост и апикальное тельце или Spitzenkörper[1]

4.1. Общие представления о морфогенезе и типах роста у грибов

Большинство грибов (исключая хитридиевые грибы) по способу *морфогенеза* могут быть разделены на две категории: дрожжи (почкующиеся и делящиеся), которые не имеют настоящих гиф и способны формировать только псевдогифы (например, *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe*), и мицелиальные грибы, формирующие настоящие гифы (например, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, рис. 26). Таллом Chytridiomycota представлен одиночной клеткой, часто без клеточной стенки, ризомицелием или настоящим несептированным мицелием.

Мицелий грибов имеет постоянный *поляризованный* асимметричный рост за счет деятельности апикальной клетки. В то же время у дрожжей поляризованный рост непостоянный, встречается на определенных стадиях жизненного цикла, происходит с меньшей скоростью и чередуется с *изотропным* симметричным ростом клеток. Так, например, скорость роста гифы *N. crassa*

---

[1] Сокращения

М — митоз

МАРК — митоген-активируемые протеинкиназы

ПТВ — полярное тело веретена

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия

Ц — цитокинез

ЦОМТ — центр организации микротрубочек веретена деления или **МТОС** (англ. microtubule-organizing centres).

ЦСВ — (англ. VSC, vesicle supply centre) центр снабжения везикулами

ЭР — эндоплазматический ретикулум

Arp2/3 — белковый комплекс, состоящий из семи доменов, который играет главную роль в регуляции актинового цитоскелета.

cdc (англ. cell division cycle) — цикл деления клетки

G_1, G_2 — стадии интерфазы клеточного цикла: G_1-фаза (от англ.*gap* — промежуток), или фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов: G_2-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.

GAP — белки, активируемые ГТФазой, контролирующие активность **G** белков.

GFP (англ. green fluorescent protein) — зеленый флуоресцентный белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его синим светом.

IP_3 — инозитол трифосфат

SNARE (от «SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) **R**eceptor») — большое семейство интегральных мембранных белков, облегчающих слияние мембран, участвующих в экзоцитозе грибов и животных. Белки **SNARE** делятся на две категории: везикулярные или **vSNAREs,** которые встроены в мембрану транспортируемой везикулы, и целевые или **tSNAREs** (англ. target-SNAP receptors), которые определяют место связывания мембраны везикулы в воспринимающем компартменте, например, цитоплазматической мембране.

Spitzenkörper в переводе с немецкого языка — апикальное тельце

WASP (сокр.Wiscott-Aldrich Syndrome) — белки семейства участвуют в передаче сигнала от рецептора на поверхности клетки к актиновому цитоскелету.

составляет 16 мкм в минуту, а скорость роста клетки дрожжей *S. cerevisiae* — 0,16 мкм в минуту.

У мицелиальных грибов только при прорастании спор (набухание споры), также как у дрожжей, происходит изотропное растяжение. В этот период наблюдается равномерное отложение материала плазматической мембраны и клеточной стенки по всему периметру клетки (I, рис. 26). На следующем этапе морфогенеза происходит выбор места для будущей ростковой трубки или почки (создание полярности, PE, рис. 26), после чего материал и аппарат синтеза новой плазматической мембраны и клеточной стенки перенаправляются к этому узкому выбранному месту и происходит появление ростковой трубки (или почки) в процессе поддержания полярности (PM, рис. 26). В дальнейшем у мицелиальных грибов осуществляется направленный синтез плазматической мембраны и клеточной стенки, обеспечивающий апикальный рост зародышевой гифы (PM, рис. 26).

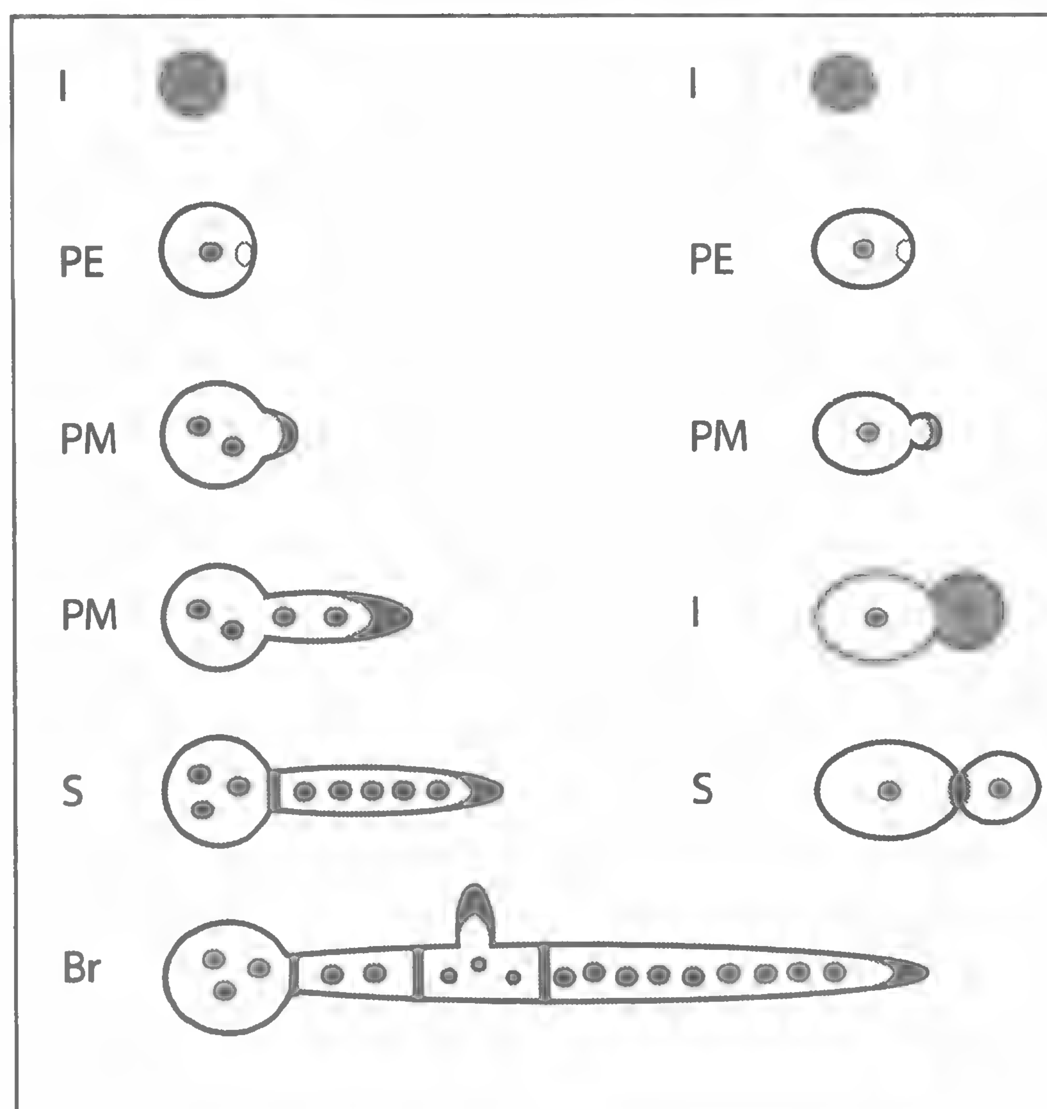


Рис. 26. Морфогенез у мицелиальных грибов (слева) и почкующихся дрожжей (справа).
Обозначения: I — изотропное растяжение; PE — создание полярности; PM — поддержание полярности; S — септирование; Br — ветвление. Серые овалы представляют интерфазные ядра; черные овалы — митотические ядра; маленькие серые кружки — кортикальные маркеры. Серым цветом закрашены районы роста. (Momany, 2002).

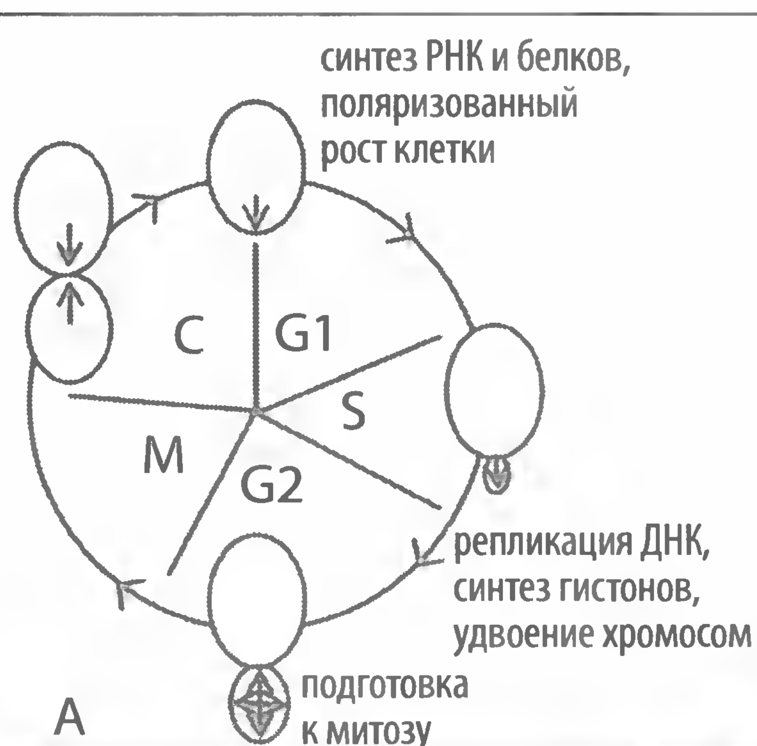
У почкующихся дрожжей материал плазматической мембраны и клеточной стенки начинает откладываться *дисперсно* и почка растет изотропно (I, рис. 26). По завершению роста почки происходит цитокинез и отделение дочерней клетки от материнской. Разделившиеся клетки растут изотропно.

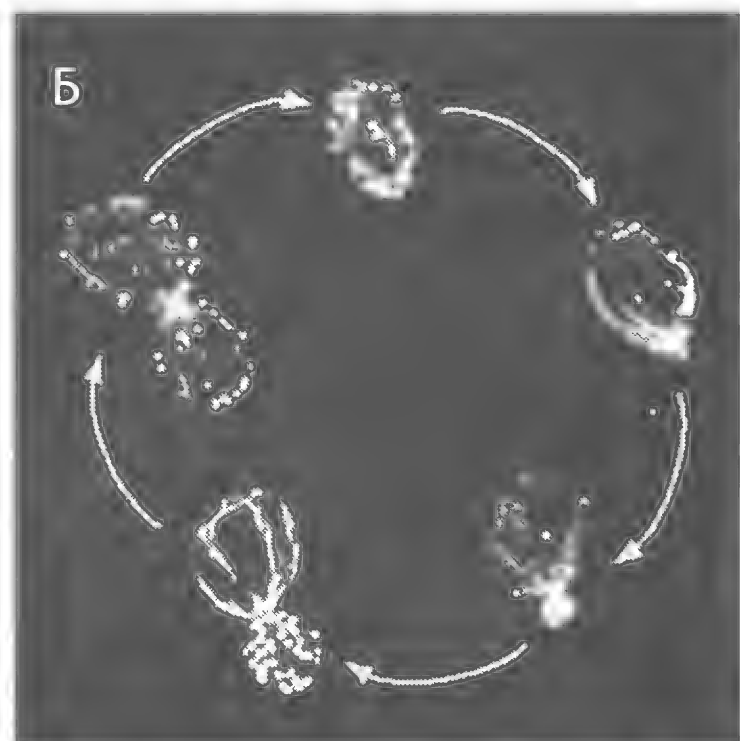
У мицелиальных грибов, однако, смежные клетки остаются связанными (см. раздел «Септы»). Поляризованный рост продолжается вдоль основной гифы и боковых веточек.

Смена образцов роста сопровождается разными образцами поведения цитоскелета — актина. Так, локализация актина (рис. 27А, Б) меняется от апикальной в случае поляризованного роста на диффузную при изодиаметрическом росте (см. подробно в главе «Цитоскелет»).

Некоторые грибы способны расти вегетативно, имея две и более разных морфологий (гифа, дрожжи и псевдогифа, рис. 28). Их называют *диморфными*. Морфологическая пластичность диморфного гриба *Candida albicans* определяет его вирулентность, а мицелиальный рост играет ключевую роль в инфекционном процессе этого патогенного для человека гриба. Тип морфогенеза формируется в ответ на сигналы окружающей среды, передающиеся через *МАРК путь сигнальной трансдукции*. Поляризованный мицелиальный рост сопровождается накоплением кортикального актина на апексе гифы *C. albicans* (рис. 27В).

Механизмы поляризованного роста у дрожжей и мицелиальных грибов имеют определенное сходство, но есть и различия. У клеток дрожжей поляризованный рост обусловлен электрической поляризацией клетки, градиентом ионов кальция, кортикальными маркерами, белковыми комплексами (*полярисома*, *экзоциста* и др.), везикулами и элементами цитоскелета. Все они в совокупности обеспечивают невысокий градиент синтеза клеточной стенки. У септированных мицелиальных грибов поляризованный рост осуществляется не только при участии всех перечисленных выше компонентов, но и апикального тельца.





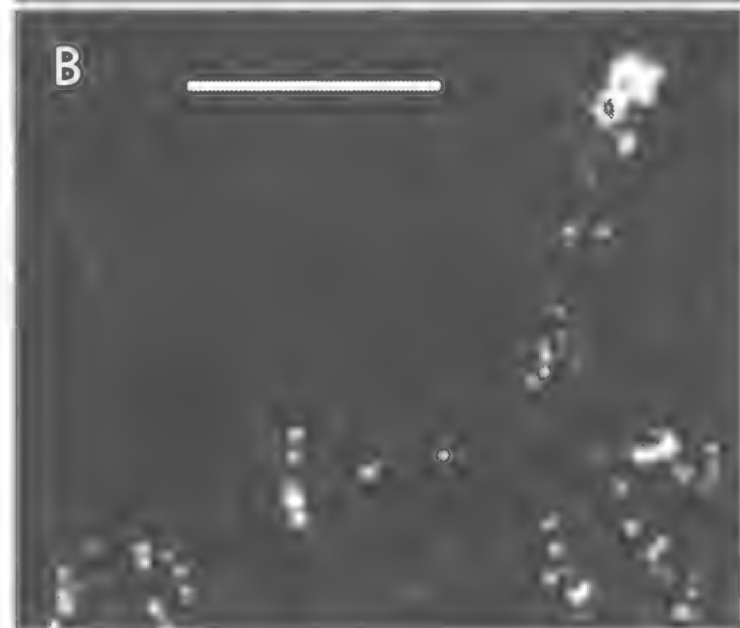


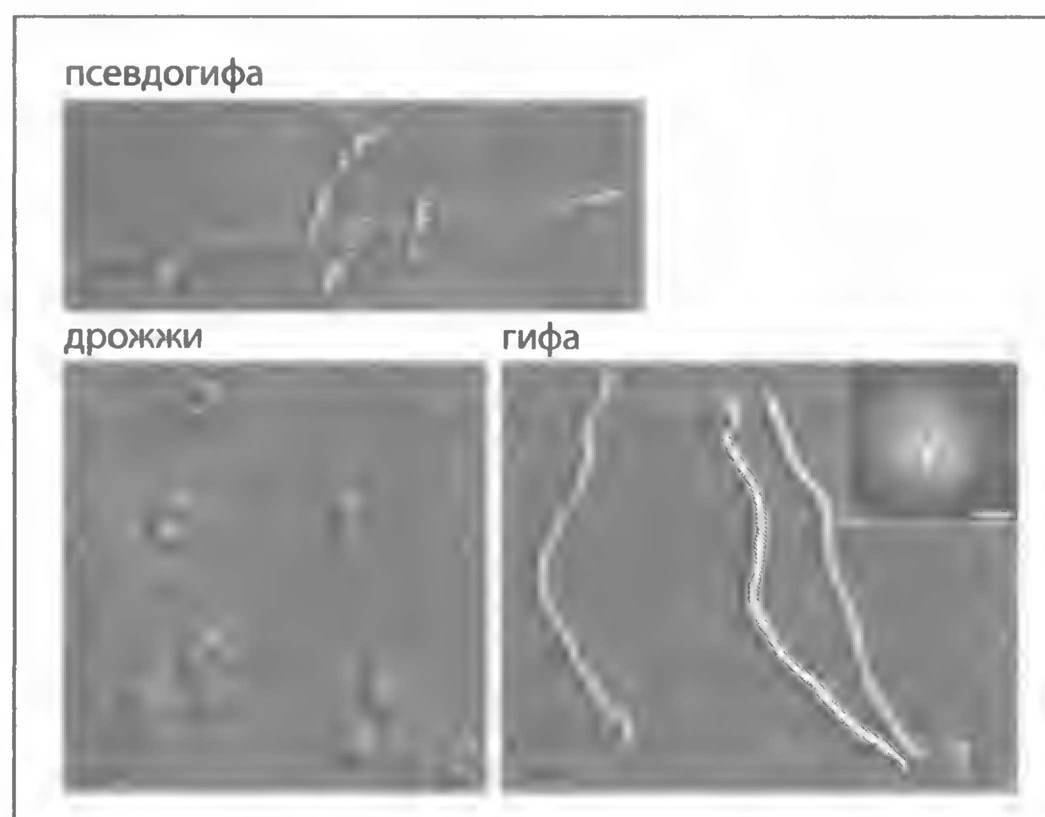
Рис. 27. Поляризованный рост и распределение актина в клетках грибов.

А. Поляризованный рост дрожжей связан с образцами поляризации актина: пока рост ограничен почкой, образец роста переключается от апикального к изотропному в стадии G_2. После митоза (М) в процессе цитокинеза (С) рост направлен к почечному рубцу материнской клетки и связан с формированием вторичной септы.

Б. Поляризация актинового цитоскелета в клеточном цикле *S. cerevisiae*. В непочкующихся клетках кортикальные частицы актина собраны со стороны зарождающейся почки, вдоль которой ориентированы филаменты актина. В маленьких почках нити актина ориентированы к кончику почки, где собраны кортикальные частицы. В клетках с крупными почками актиновые нити направлены к почечному рубцу материнской клетки — актиновые нити и частицы не поляризованы в почке После митоза они поляризуются в направлении почечного рубца материнской клетки.

В. Поляризация актиновых кортикальных глобул у гиф *Candida albicans*, о чем свидетельствует скопление кортикального актина на апексе гифы. Масштабный отрезок 5 мкм (Sudbery, Court, 2007).

Рис. 28. Морфология дрожжевых клеток, гифы и псевдогифы *Candida albicans*. Масштабный отрезок 5 мкм (Sudbery, 2011).



4.2. Организация и динамика апикального тельца или Spitzenkörper

Одной из характерных черт грибов с настоящими гифами, обладающими поляризованным ростом, является *Spitzenkörper* (в переводе с нем. «апикальное тельце»), которое и обеспечивает поляризованный рост. Оно было впервые обнаружено H. Brunswick при окрашивании железным гематоксилином в 1924 г. в кончике гифы *Coprinus* spp. и это открытие оставалось незамеченным до тех пор, пока исследования M. Girbardt в 1957 г. не продемонстрировали существование Spitzenkörper в живых гифах *Polystictus versicolor* (в современной классификации *Trametes versicolor*) методом фазового контраста.

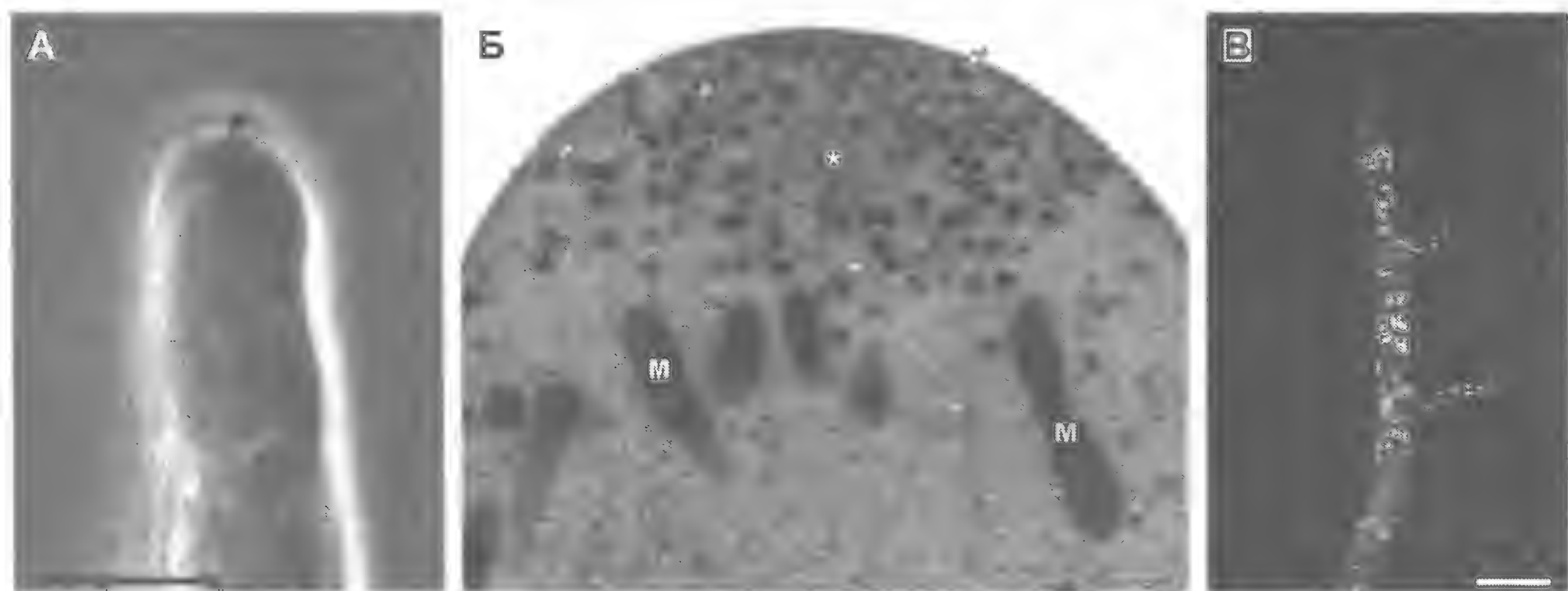


Рис. 29. Spitzenköper в кончике гифы *Neurospora crassa*.
А. Spitzenkörper (черная стрелка) видно как темный овал у кончика гифы Масштабный отрезок 10 мкм. Снимок был сделан с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX51 с фазово-контрастной оптикой.
Б. Spitzenkörper заметно как скопление крупных апикальных везикул (стрелка), окружающих скопление мелких везикул (звездочка). Снимок сделали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии после криофиксации и замораживания-замещения кончика гифы. Заметны микротрубочки (головки стрелок) и митохондрии (М). Масштабный отрезок 3,3 мкм.
В. Двойное окрашивание мембранного материала живых клеток с помощью FM4-64 и ядер H1-GFP, заметно накопление мембран-связанных везикул на кончике гифы. Масштабный отрезок 20 мкм (Virag, Harris, 2006).

Апикальное тельце очень динамичная клеточная структура с разным составом и формой, не ограниченная мембраной, приуроченная к месту поляризованного роста и растяжения клетки (рис. 29). Эта структура присутствует у активно растущих кончиков и исчезает во время остановки роста.

Изменение положения апикального тельца влияет на направление роста гифы (рис. 30). Исследования с помощью электронной трансмиссионной микроскопии показали присутствие в Spitzenkörper микровезикул размером 30–40 нм, макровезикул размером 70–120 нм, микрофиламентов, микротрубочек и рибосом (рис. 29Б).

Присутствие рибосом в Spitzenkörper указывает на интенсивный синтез белка в кончике гифы. Вместе с микровезикулами, микротрубочками и микрофиламентами рибосомы образуют центр Spitzenkörper.

В одной из работ по сравнительному исследованию ультраструктуры кончика гифы у грибов из разных таксонов по сравнению с грибоподобным протистом — оомицетом *Pythium aphanidermatum* были продемонстрированы четкие различия в структуре апикальной зоны гифы. Кончик гифы *P. aphanidermatum* заполнен, в основном, везикулами двух типов и небольшим количеством рибосом. Маленькие везикулы имеют плотный темноокрашенный матрикс, а крупные везикулы — дисперсный светлоокрашенный матрикс, по структуре подобный стенке гифы. Присутствуют также везикулы, промежуточные по способности к окрашиванию между двумя предыдущими формами. Везикулы у Oomycetes распределены более или менее равномерно по всей апикальной зоне без специального района кластера везикул.

Кончик гифы зигомицета *Gilbertella persicaria,* имеющего несептированный мицелий заполнен крупными и мелкими везикулами, распространенными по всему апикальному своду гифы. Причем, крупные везикулы сконцентрированы у самого апекса. Промежуточ-



Рис. 30. Изменения в направлении роста гифы *Trichoderma viride.* В течение 9 мин наблюдали за изменением положения Spitzenkörper после воздействия лазерным инструментом (белые звездочки). Черные стрелки показывают положение Spitzenkörper в начале и конце эксперимента (Bartnicki-Garcia, 2002).

ные везикулы по способности к окрашиваемости осмием также присутствуют. В субапикальной зоне рибосомы и везикулы распределены равномерно, а в апикальной зоне, где сконцентрированы крупные везикулы, рибосом мало.

Медианный продольный срез через кончик гифы аскомицета *Aspergillus niger* позволил увидеть кластер апикальных везикул (Spitzenkörper), который содержал зону плотно расположенных мелких везикул и немногочисленные рибосомы, а крупные везикулы были локализованы вокруг этого кластера. В основании апикальной зоны растущего кончика в цитоплазме локализованы рибосомы, цистерны Гольджи и немногочисленные везикулы.

На медианном продольном срезе через апикальную зону гифы базидиомицета *Armillaria mellea* также хорошо заметен кластер везикул или апикальное тельце и микротрубочки. Его центральный район не содержит везикул и представляет собой темно-окрашенный центр.

По результатам цитологического исследования были составлены диаграммы структуры апикального кончика исследуемых объектов (рис. 31), отражающие закономерности в распределении микро- и макровезикул, принимающих участие в росте гифы и синтезе компонентов плазматической мембраны и клеточной стенки. Только у септированных грибов (аско- и базидиомицетов) был выявлен кластер везикул, названный апикальным тельцем, принимающий участие в росте кончика гифы. У грибов с несептированным мицелием (зигомицеты) в поляризованном росте гифы везикулы также принимают участие, но они не организованы в апикальный кластер.

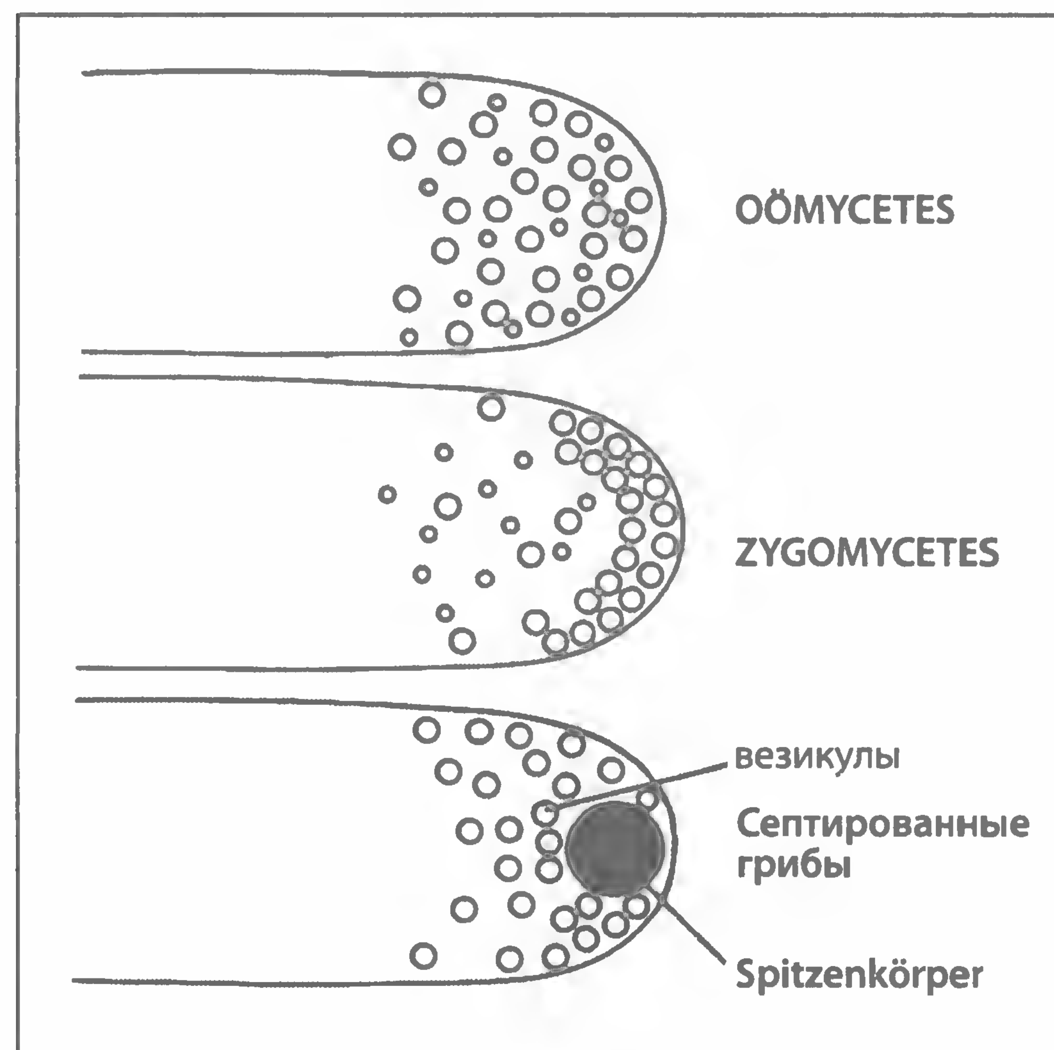


Рис. 31. Сравнение апикальной организации гифы у псевдогрибов и грибов (Grove, Bracker, 1970).

Дальнейшие исследования септированных грибов R. Lopez-Franco и C.E. Bracker с помощью световой микроскопии выявили восемь разных образцов организации апикального тельца у большинства грибов и крупное Spitzenkörper у хитридиомицета *Allomyces macrogynus* (рис. 32, P9). Как видно с помощью световой микроскопии, структура Spitzenkörper имеет заметные различия у разных видов грибов (рис. 32).

Не все компоненты апикального тельца постоянно присутствуют у одного вида гриба. Более того, один кончик гифы может менять состав Spitzenkörper в процессе роста. Для начала роста гифы необходимо включение материала клеточной стенки (см. раздел 4.5) в растягивающуюся апикальную поверхность гифы. Компоненты клеточной стенки упакованы в везикулах, которые присутствуют всегда в каждом Spitzenkörper. Везикулы также содержат литические ферменты (например, микровезикулы хитосомы содержат зимогенную

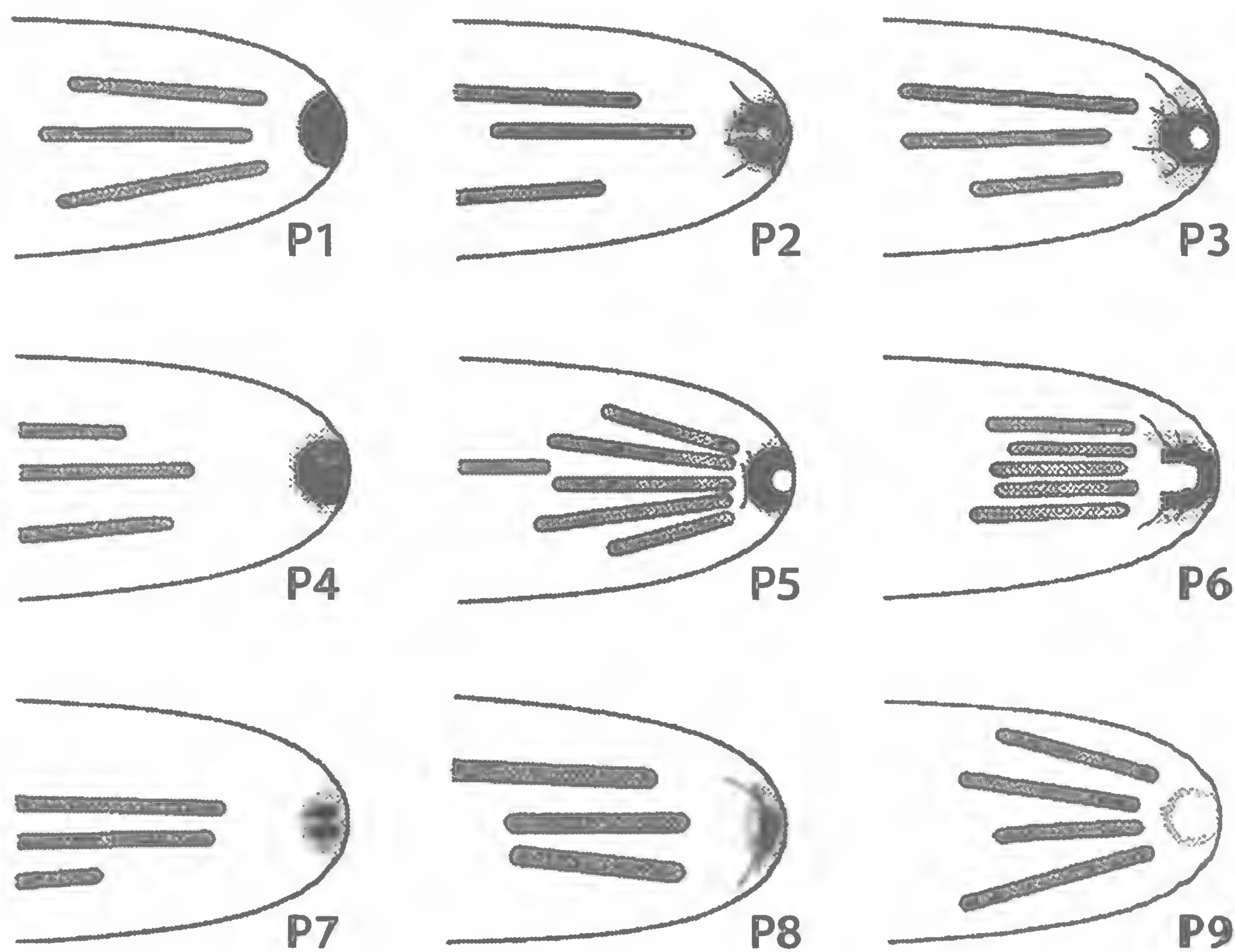


Рис. 32. В виде диаграмм представлены образцы Spitzenkörper (P1-P9) у разных видов грибов
P1. Темный кластер везикул без видимой сердцевины. На примере *Agaricus brunnescens* и *Gaeumannomyces graminis*.
P2. Темный кластер везикул открывается назад к близко расположенному светлому центру, находящегося на возвышенности везикулярного кластера. На примере двух образцов *Sclerotium rolfsii*.
P3. Темный кластер везикул с эксцентричным светлым центром обычно ориентированным к апикальному полюсу. На примере *Fusarium culmorum*, *Bipolaris maydis*, *Magnaporthe grisea*, *Trichoderma viride*.
P4. Серый кластер везикул с эксцентричным темным центром. На примере *Aspergillus niger* и *Sclerotinia sclerotiorum*.
P5. Серый кластер везикул, содержащий светлый центр, ориентированный к апексу, и темный центр, направленный назад. На примере *Morchella deliciosa* и *Galactomyces citri-aurantii*.
P6. Чашеобразный темный кластер везикул, окружающий крупную светлую сердцевину. На примере *Rhizoctonia solani* и *Gelasinospora* sp.
P7. Серое облако везикул, содержащее две и более апикальные «гранулы». На примере *Colletotrichum graminicola* и *Leptosphaerulina briosana*
P8. Плейоморфное апикальное тельце, часто в виде толстой темной ленты кластера везикул с маленьким светлым центром сзади кластера везикул. На примере двух образцов *Neurospora crassa*.
P9. Представляет апикальное тельце *Allomyces macrogynus*, для которого характерен крупный светлый центр, окруженный тонким слоем апикальных везикул. Сзади апикального тельца расположены митохондрии (López-Franco, Bracker, 1996).

форму хитинсинтетазы), кальций, маркерные белки, белки, способствующие стыковке и слиянию мембран, сигнальные белки.

Исследование нативных клеток мицелиальных грибов с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии и липофильного красителя FM4-64, специфичного к эндомембранам, показало периодические изменения в накоплении везикул в Spitzenkörper

У диморфного гриба *C. albicans* Spitzenkörper присутствует в гифе, но не обнаруживается в псевдогифе и дрожжевых клетках. Присутствие Spitzenkörper в гифе *C. albicans* может быть связано с необходимостью транспорта везикул на значительное расстояние.

4.2.1. Роль цитоскелета в сборке и функционировании апикального тельца

Компоненты для синтеза плазматической мембраны и клеточной стенки во время роста гифы образуются и подвергаются модификациям в местах удаленных от их финального назначения (эндоплазматический ретикулум, цистерны Гольджи). Далее они транспортируются в везикулах к кончику гифы при участии цитоскелета и ассоциированных с ним моторов (рис. 33). Поэтому присутствие элементов цитоскелета, микротрубочек и микрофиламентов в Spitzenkörper не удивительно, так как это как раз то место, куда доставляются

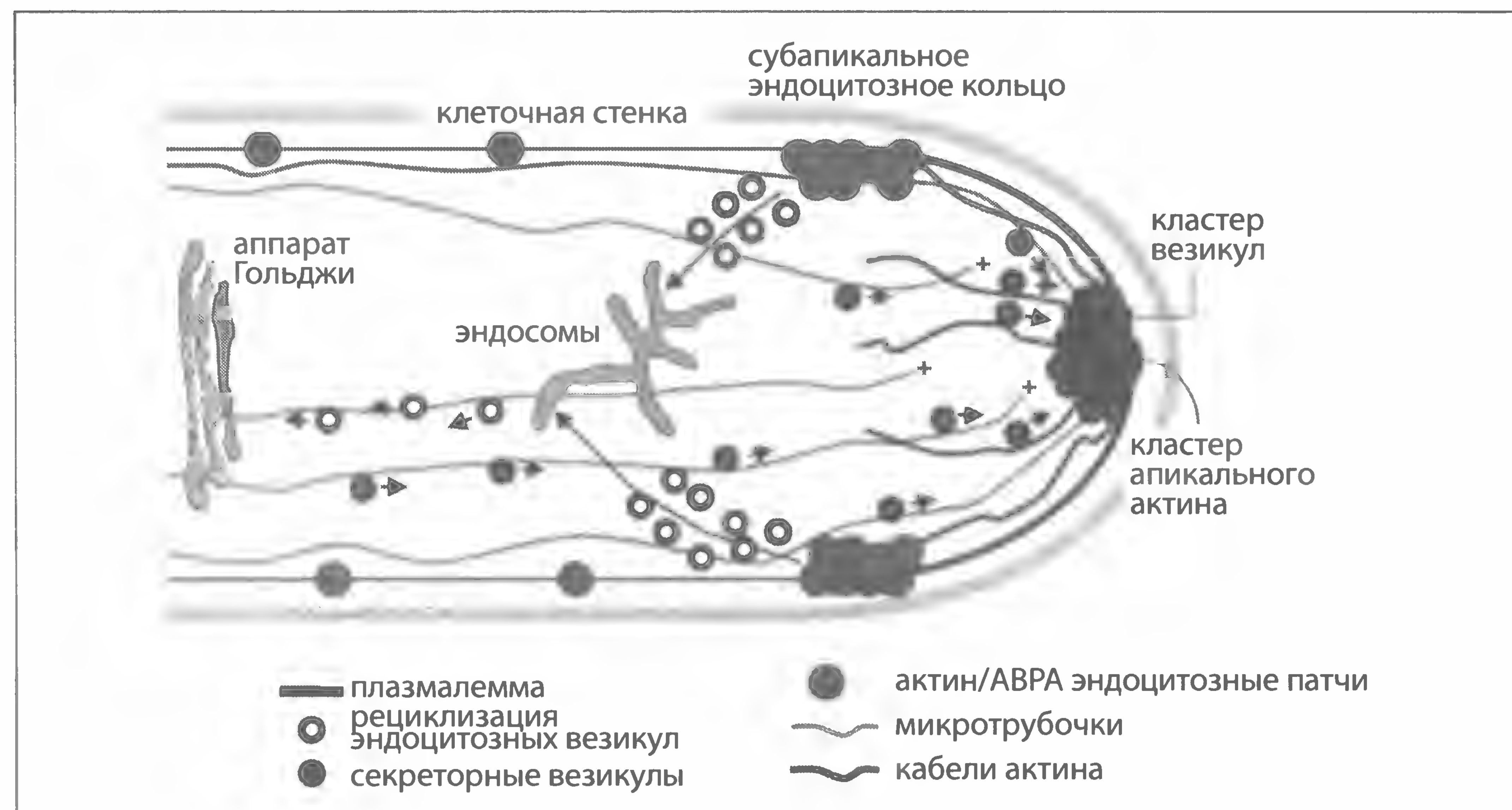


Рис. 33. Модель роста кончика гифы *Aspergillus nidulans*. Spitzenkörper обозначен в виде кластера везикул. Секреторные везикулы с содержимым, необходимым для роста кончика гифы, транспортируются к кончику при участии микротрубочек. Они контактируют с апикальным кластером везикул. Часть секреторных везикул с микротрубочек «пересаживается» на филаменты актина. Везикулы сливаются с плазматической мембраной. освобождая свое содержимое. а компоненты мембран секреторных везикул (например, SynA), включаются в плазматическую мембрану. С ростом кончика гифы кольцо из патчей актина/актинсвязывающего белка А (AbpA), участвующих в эндоцитозе, перемещается вперед, возвращая SynA и другие компоненты мембран везикул эндоцитозным везикулам для повторного использования. Возможен транспорт эндосом с SynA-содержащими мембранами к эквиваленту Гольджи при участии динеина и микротрубочек, от него секреторные везикулы, содержащие предшественники и биосинтетические ферменты клеточной стенки, переносятся к кончику гифы (Taheri-Talesh et al., 2008).

везикулы. Микротрубочки играют важную роль для поляризованного роста гифы. поскольку являются путями транспорта везикул на длинные дистанции. Разрушение микротрубочек приводит к резкому сокращению скорости роста кончика гифы, хотя рост еще может продолжаться с низкой скоростью, что демонстрирует участие микротрубочек в быстром росте кончика гифы. Микротрубочки, участвующие в апикальном росте гифы, не связаны с митотическими микротрубочками, так как структура Spitzenkörper не изменяется в процессе митоза, сборки и разборки митотического веретена деления. Множество микротрубочек сохраняется в кончике гифы независимо от стадии клеточного цикла. Центр организации

микротрубочек (ЦОМТ, англ. microtubule-organizing centres, MTOC) постоянно присутствует в гифе и связан с положением ядра. Есть предположение, что Spitzenkörper может выполнять роль ЦОМТ, так как занимает ключевую позицию в транспорте везикул к кончику гифы. Однако *g*-тубулин, характерный для ЦОМТ, к настоящему времени обнаружен только у Spitzenkörper хитридиомицета *Allomyces macrogynus*.

С челночными везикулами и органеллами в цитоплазме, переносимыми микротрубочками, ассоциированы две группы адапторных моторных белков: *кинезины* и *динеин/динактиновый* комплекс. Кинезины ответственны за плюс конец направленного антероградного транспорта (в сторону кончика гифы), в то время как динеин/динактиновый комплекс ответственен за минус конец направленного ретроградного транспорта (в сторону от кончика гифы к септе). Потеря функции кинезина приводит к измененному морфогенезу гифы и повреждению исследуемого Spitzenkörper. А дефицит динеина вызывает снижение количества везикул в Spitzenkörper. Таким образом, *ретроградный* и *антероградный транспорт* необходимы для морфогенеза гифы и сборки Spitzenkörper.

Участие актина в сборке и функционировании Spitzenkörper у грибов было продемонстрировано методом ингибиторного анализа и мутантных штаммов. Разборка микрофиламентов в цитоплазме приводит к прекращению роста кончика и исчезновению Spitzenkörper, в то время как мутация по гену актина приводит как к измененному распределению актина, так и уменьшению размера Spitzenkörper. Важная роль в функционировании апикального тельца принадлежит локализованному на кончике кортикальному актину, участвующему в транспорте везикул на заключительном этапе. Моторный белок MyoA, ассоциированный с актином (класс I), является важным для поляризованного роста, так как участвует в транспорте везикулы к кончику гифы.

В структуру апикального тельца могут быть включены и другие элементы, например, *филасомы*. По данным иммуноцитохимического анализа аскомицета *Sclerotium rolfsii* филасомы являются ультраструктурным эквивалентом актинового пятна, имеют сферическую форму с диаметром 100–300 нм и состоят из одной микровезикулы (35–70 нм), окруженной тонкими филаментами, которые содержат актин. Вероятно, Spitzenkörper закрепляет элементы F-актинового цитоскелета растущего апекса. В растущем кончике F-актин локализован в цитоплазме в виде фибриллярной радиальной сети, расходящейся в разные стороны от самого края апекса к апикальному тельцу.

4.2.2. Сравнение структуры апикального тельца грибов с аналогичными структурами других эукариот

4.2.2.1. Поляризованный рост ризоидов Chara

Полярно растущие растительные клетки также показывают присутствие Spitzenkörper. Однако его структура отличается от Spitzenkörper грибов. Spitzenkörper ризоидов водоросли *Chara carolina*, например, состоит из агрегатов эндоплазматического ретикулума, везикул, центрального пучка актина с расходящимися актиновыми филаментами по всем направлениям, *профилина*, фактора, деполимеризующего актин, и спектрин-подобных белков.

4.2.2.2. Поляризованный рост оомицетов и пыльцевых трубок

Несмотря на то, что Spitzenkörper является ключевым компонентом роста кончика гифы у септированных грибов, поляризованный рост может осуществляться и без его участия. Примером могут быть растущие гифы Oomycota, например, *Saprolegnia ferax*, и пыльцевые трубки растений, не имеющие Spitzenkörper. Однако перечисленные выше полярно растущие структуры обладают одной общей чертой. Они обладают апикальным градиентом Ca^{2+} у кончика гифы. Поддержание такого градиента происходит благодаря присутствию

ионных каналов Ca^{2+} в апикальной мембране, которые позволяют ионам кальция проходить по концентрационному градиенту снаружи внутрь клетки. Концентрация Ca^{2+} у эукариот регулируется и поддерживается на определенном уровне в цитоплазме двумя способами:

- ✓ Кальциевым каналом, локализованным в плазматической мембране, который выкачивает кальций из клетки (Ca^{2+}-АТФ-аза),
- ✓ Кальциевым каналом, локализованным в вакуолярной мембране, который обеспечивает запасание ионов кальция в вакуолях гифы.

Хотя роль и функции кальциевого градиента в гифе грибов еще предстоит исследовать, ионы Ca^{2+}, как известно, регулируют сборку цитоскелета и способствуют слиянию везикул с мембранами, поэтому присутствие высокого градиента кальция на кончике гифы грибов (tip-high calcium gradient) похоже является важным фактором в создании и поддержании апикальной полярности в гифе. Вклад кальция в поляризованный рост у эукариотических систем нашел отражение в одной из моделей поляризованного роста грибов (см. ниже раздел 4.5).

4.3. Онтогенез Spitzenkörper и факторы, создающие полярность у грибов

4.3.1. Онтогенез Spitzenkörper

Важный аспект изучения полярности и морфогенеза гифы это *онтогенез* Spitzenkörper. В понимание цикла развития апикального тельца существенный вклад внесли наблюдения за ростом мицелия мутантного штамма 'ramosa' мицелиального аскомицета *Aspergillus niger.* В отличие от дикого штамма с моноподиальным ветвлением мицелий штамма 'ramosa' ветвился дихотомически. Апикальное тельце исчезало каждый раз перед формированием новых дихотомических веточек. Два новых Spitzenkörper появлялись по одному у вершины новой веточки после того, как становились заметными *инициали* этих веточек. Хотя можно предположить, что центр первоначального Spitzenkörper сохраняется и делится, но на данный момент не было получено доказательств в пользу этого. Вероятнее всего, Spitzenkörper формируется *de novo*. Формирование апикального тельца *de novo* было продемонстрировано в процессе бокового ветвления у *N. crassa.* В пользу предположения о формировании апикального тельца *de novo* свидетельствует поведение спутника Spitzenkörper, который находится на близком расстоянии от кончика гифы до слияния с Spitzenkörper. Спутник Spitzenkörper представляет собой маленькую группу везикул, которые появляются на расстоянии нескольких микрометров от апикального полюса, быстро мигрируют к апексу гифы и поглощаются основным Spitzenkörper, таким образом, внося вклад в рост гифы. Этот способ поглощения Spitzenkörper спутника было предложено считать характерной чертой пульсирующего роста кончика гифы. Во время роста гифы происходит чередование периода быстрого и медленного роста. Пульсация варьирует в зависимости от вида гриба и в среднем составляет от 2,7 до 14 пульсаций в минуту.

Хотя связь Spitzenkörper с поляризованным ростом очевидна, роль апикального тельца в морфогенезе гифы еще не вполне ясна. Скорее всего, оно вносит свой вклад в быстрый поляризованный рост мицелия. Отсутствие Spitzenkörper в гифе, прекратившей рост, предполагает отсутствие видимого проявления динамики везикул и движения клеточных компонентов к кончику гифы. Имеется несколько фактов в пользу сказанного. Один из них — различия в форме и составе Spitzenkörper в одной гифе в течение времени, наблюдаемые при окрашивании FM4-64 и исследовании ультраструктуры. Другой факт — это изменение положения Spitzenkörper в процессе роста. В процессе быстрого роста Spitzenkörper находится на самом кончике (что соответствует высокой плотности везикул), по мере снижения скорости роста гифы апикальное тельце удаляется от кончика и исчезает во время остановки роста или перед подготовкой к апикальному ветвлению, когда плотность везикул значительно ниже.

Таким образом, Spitzenkörper — это динамичная структура, присутствующая в районах высоко поляризованного роста в процессе морфогенеза гифы у септированных грибов. Его состав варьирует со временем и между видами грибов. Апикальное тельце связано с клеточными функциями, необходимыми для синтеза клеточной стенки. Эти клеточные функции включают организацию и транспорт компонентов, предназначенных для встраивания в плазматическую мембрану и клеточную стенку, а также сборку элементов, вовлеченных в регуляцию поляризованного роста.

4.3.2. Факторы, создающие полярность у грибной клетки

Апикальное тельце является структурой, активно собираемой в процессе трансформации внутренних и внешних сигналов в поляризованный рост. Помимо него у грибов присутствуют разные факторы полярности, участвующие в поляризованном росте клетки.

4.3.2.1. Сигнальный фактор полярности Cdc42

К сигнальным факторам полярности относятся сигнальный белок Cdc42 (cdc — cell division cycle) и другие Rho ГТФазы, включающие Rac-подобные белки (субсемейство семейства Rho ГТФаз, маленькие сигнальные G белки). Cdc42 регулирует многие аспекты полярного роста и морфогенеза клеток грибов. Белок Cdc42 определяет положение филаментов актина в центре поляризованного роста у поверхностного белкового комплекса, называемого полярисома. В участках, маркированных Cdc42, ГТФаза активируется действием гуаниннуклеотид-обменного фактора (GEF) Cdc24.

В процессе почкования *S. cerevisiae* белки, ассоциированные с предыдущим местом почкования, определяют направление поляризованного роста будущей почки путем передачи сигналов на комплекс Cdc42. Процессу выбора направления поляризованного роста почки способствует белок Bud1 Ras-подобная ГТФаза. У гриба *Ashbya gossypii* с дихотомическим ветвлением гиф белок Rsr1/Bud1 необходим для значимого поляризованного роста гифы.

Другим примером может быть восприятие и передача сигнала извне и последующая стимуляция поляризованного роста при спаривании двух клеток почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*, когда достигается наивысшая концентрация феромона в среде. Сигнал от феромона воспринимается и передается через G-белок сигнального пути, вызывая локальное накопление белка Cdc42 и его гуанин нуклеотид-обменного фактора (GEF) Cdc24. Активируемые ГТФазой белки (GAP), Bem3 и Rga1, и гуанин нуклеотид-диссоциирующий ингибитор (GDI) Rdi1 регулируют активность белка Cdc42. Внутренние и наружные сигналы принимаются Cdc42-сигнальным белковым комплексом, передаются на p21 активированные киназы (PAKs), Cla4 и Ste20, и затем на их эффекторы, которые транслируют эту информацию в локализованный ответ роста.

У мицелиальных грибов отсутствуют гомологи кортикальных сигнальных молекул почкующихся дрожжей, таких как Bud8 и Bud9, но гомологи Cdc42 и его регуляторы имеются. В отличие от дрожжей гомологи Rac, по-видимому, играют важную роль в полярности мицелиальных грибов *Penicillium marneffei* и *Colletotrichum trifolii*, но гомологи комплекса Par3/Par6/aPKC не идентифицированы. Это предполагает, что хотя направляющие модули машины поляризации консервативны, путь, которым они собираются и контролируют поляризованный рост, может быть уникальным у мицелиальных грибов.

4.3.2.2. Полярисома

Ключевой мультибелковый комплекс почкующихся дрожжей, участвующий в регуляции перемещения актинового цитоскелета и аппарата секреции, необходимых для поляризованного роста грибов, называют полярисомой. Полярисома дрожжей состоит из белков Bni1, Spa2, Bud6 и Pea1, локализованных в виде полумесяца у места зарождающейся почки, и направляет микрофиламенты актина и другие клеточные компоненты к участкам

поляризованного роста. Опорный белок Spa2 контролирует сборку комплекса полярисомы. Формин Bni1 связан с другими компонентами полярисомы и также как Rho ГТФазы передает сигнал к Cdc42 комплексу. Белок Bud6 взаимодействует с Bni1 и вместе с ним отвечает за сборку филаментов актина (подробно см. гл.5. Цитоскелет).

Несмотря на то, что для мицелиальных грибов в сравнении с почкующимися дрожжами меньше известно о компонентах, контролирующих поляризованный рост, на данный момент полагают, что они отличаются от дрожжей присутствием ряда структурных компонентов. Увеличение секвенированных геномов грибов дало возможность провести генетический поиск у них компонентов поляризованного роста. Поиск показал присутствие гомологов компонентов полярисомы дрожжей Bni1, Spa2 и Bud6, при этом гомолог Pea1 не был обнаружен. Выявленная особенность геномов мицелиальных грибов подтверждает имеющееся различие в контроле поляризованного роста между мицелиальными и не мицелиальными грибами.

У *A. nidulans* был охарактеризован гомолог Bni1 белок SepA и показано его участие в поддержании полярности и формировании септы. С помощью маркера GFP (зеленого флуоресцентного белка, green fluorescent protein) показано, что SepA локализован у апикальной мембраны в районе кончика гифы гриба. Распространение маркированного формина у кончика гифы предполагает его связь с Spitzenkörper. Недавно был выявлен белок уникальный для грибов - MesA и показана его функция в удержании SepA в участке поляризации. Два других компонента полярисомы гомолог Spa2, SpaA, и гомолог Bud6, BudA, также были обнаружены.

Для *C. albicans* было показано участие двух компонентов полярисомы Spa2 и Bud6 в формировании Spitzenkörper.

Уже получены сведения о присутствии одного из белковых компонентов полярисомы Spa2, локализованного совместно с апикальным тельцем, у *N. crassa.* Мицелиальные грибы имеют более комплексный поляризованный морфогенез, чем дрожжи, что предполагает существование дополнительных функций у полярисомы. При сравнении организации и динамики компонентов полярисомы (Bni1, Bud6 и Spa2) на разных стадиях развития *N. crassa* было показано их участие в апикальном росте кончика гифы, слиянии клеток, формировании и закупоривании септы, а также реполяризации кончика мицелия.

Секреторные везикулы эквивалента Гольджи у почкующихся дрожжей транспортируются по актиновым филаментам ко второму белковому комплексу — экзоциста.

4.3.2.3. Экзоциста и другие белковые комплексы

Комплекс **экзоцисты** вовлечен в стыковку везикул и их слияние с плазматической мембраной. Комплекс белков экзоцисты обнаружен в местах формирования септы и экзоцитоза у дочерних клеток почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*. Он представлен следующими белками: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 и Exo84, взаимодействующими с факторами, контролирующими полярный рост: Rho ГТФазой Cdc42, Rho1, Rho3, Sec4, Rab ГТФазой, локализованной на поверхности мембраны везикул, и с белками секреции. Таким образом, белки экзоцисты занимают пограничное положение в процессах полярного роста и секреции.

Мицелиальные грибы имеют гомологи комплекса экзоцисты, а также маленькие ГТФазы из семейства Rab генов, которые регулируют функции_экзоцисты. Этот комплекс у мицелиальных грибов также содержит восемь белков: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 и Exo84, они взаимодействуют с Rho ГТФазой Cdc42, Rho1, Rho3, а также с Sec4 и Rab ГТФазой, присутствующей на поверхности мембраны везикул. Поиск мутантных генов, продукты которых вносят вклад в поляризованный рост у *N. crassa,* показал, что мутация в гомологе Sec5 комплекса экзоцисты приводит к округлым конидиям и измененной морфологии гифы, что указывает на его вклад в полярность. Гомолог одного из генов семейства Rab ГТФаз, Sec4, у *A. niger* отсутствует. У дрожжей эта везикулярная мембра-

носвязанная Rab ГТФаза взаимодействует с компонентом экзоцисты Sec15 и активирует комплекс экзоцисты. Вероятно, мицелиальные грибы имеют дополнительную Rab ГТФазу по сравнению с *S. cerevisiae*. Данная особенность может отражать отличия в механизмах, которые регулируют функции экзоцисты.

Совсем недавно была показана локализация гомолога белка Sec3 у *A. nidulans* в районе кончика гифы.

Растворимый N-этилмалеимид-чувствительный белок (NSF), прикрепленный к белковым рецепторам (SNAREs), обеспечивает слияние между везикулами и воспринимающими мембранами. Каждый тип мембран имеет специфический белок SNARE. На кончике гифы t-SNAREs плазматической мембраны предположительно образуют пару с v-SNAREs мембраны везикул. SNAREs присутствуют у мицелиальных грибов, два белка t-SNAREs плазматической мембраны, nsyn1 и nsyn2, охарактеризованы у *N. crassa*.

Белковый комплекс Arp2/3 у мицелиальных грибов важен для поддержания полярности и включает белки: Arp2, Arp3, Arc40, Arc35, Arc18, Arc19 и Arc15. Комплекс Arp2/3 отвечает за инициацию ветвления актиновых филаментов, которые образуют кортикальную актиновую сеть, и за эндоцитоз. Он локализован около актиновых пятен, примыкающих к плазматической мембране в апикальном районе растущего кончика гифы. Компоненты этого комплекса еще не обнаружены в Spitzenkörper. Однако активаторы Arp2/3-зависимой полимеризации актина, такие как члены семейства белков Wiscott-Aldrich Syndrome (WASP) присутствуют на кончике поляризованных клеток и взаимодействуют с полярными компонентами, такими как Cdc42.

4.4. Вклад полярисомы, экзоцисты и апикального тельца в поляризованный рост грибов

Рассмотрим соотношение факторов полярности у грибов на двух примерах.

Апикальное тельце было идентифицировано у генетически близкого почкующимся дрожжам *S. cerevisiae* мицелиального гриба *Ashbya gossypii*. Изменение скорости роста мицелия при прорастании споры *A. gossypii* в течение 24 ч составляет от 0,2 мкм/мин до 3,5 мкм/мин, что связано с перераспределением компонентов, обеспечивающих поляризованный рост: экзоцисты, полярисомы и апикального тельца (рис. 34).

Мы уже знаем, что материал мембраны и клеточной стенки транспортируется к кончику гифы через систему секреторных везикул. При наблюдении быстрорастущей гифы методом фазового контраста в своде апекса хорошо заметно апикальное тельце. В электронном микроскопе в этой области наблюдали кластер мелких везикул 20–40 нм и более крупных — 80–100 нм. У медленнорастущей гифы апикального тельца обнаружено не было.

Наблюдение за распределением трех компонентов экзоцисты, помеченных GFP (зеленым флуоресцирующим белком), у медленнорастущей гифы выявило кортикальную шапочку в кончике свода, в то время как у быстрорастущей гифы эти белки занимали шаровидную область (рис. 34А, Б). Причем эта область совпала с областью локализации апикального тельца (колокализация) при окрашивании флуоресцентным красителем FM4-64. Никакого апикального тельца не выявлялось при кортикальном распределении компонентов экзоцисты. Следовательно, у быстрорастущей гифы компоненты экзоцисты, связанные с везикулами, являются частью апикального тельца/Spitzenkörper, более того, формирование Spitzenkörper зависит от скорости роста гифы (рис. 34Б, В). Распределение факторов полярности, компонентов полярисомы и актиновых патчей изображено на рис. 34.

Во время индукции мицелиального роста (в присутствии сыворотки крови, нейтрального значения pH, 5% CO_2, что соответствует парциальному давлению в крови человека) у диморфного патогенного гриба *C. albicans* на кончике материнской клетки появляется пятно бел-

ков септинов, которое в дальнейшем при росте гифы разделяется на апикальную шапочку и пояс в основании ростковой трубки (рис. 35). Рост ее наблюдается перед стартом клеточного цикла, инициация которого происходит по достижении 15–20 мкм длины ростковой трубки. Ядро материнской клетки мигрирует в ростковую трубку и митотически делится (рис. 35). После этого одно из дочерних ядер мигрирует обратно в материнскую клетку, а другое остается в ростковой трубке с апикальной стороны от септинового пояса. Кольцо делится на два, формируется актомиозиновое кольцо и первичная септа, а затем вторичная септа (см. главу Септа и цитокинез). Первичная септа не подвергается гидролизу, как это происходит у дрожжевых клеток, поэтому два компартмента остаются вместе. После цитокинеза субапикальный компартмент, который теперь называется гифой, быстро вакуолизируется и останавливается на стадии G_1 клеточного цикла. А апикальный компартмент остается в клеточном цикле, быстро вытягивается, проходит стадию S и G_2, митоз и цикл повторяется. Во время поляризованного роста актин концентрируется на кончике гифы, а у дрожжевых клеток он распространен диффузно (рис. 27). Скорость роста гифы зависит от питательности среды. Субапикальные компартменты с медленным ростом и слабой вакуолизацией, достигнув критического объема цитоплазмы, могут вернуться в клеточный цикл. В результате этого материнская клетка может образовать вторую ростковую трубку, а субапикальный компартмент — сформировать веточку в месте септирования. Так как это происходит медленнее, чем клеточный цикл в апикальном компартменте, зрелая колония *C. albicans* слабо ветвится.

Таким образом, организация роста и развития гифы *C. albicans* явно отличается от дрожжевого и псевдогифального роста (рис. 35). Во-первых, при дрожжевом и псевдомицели-

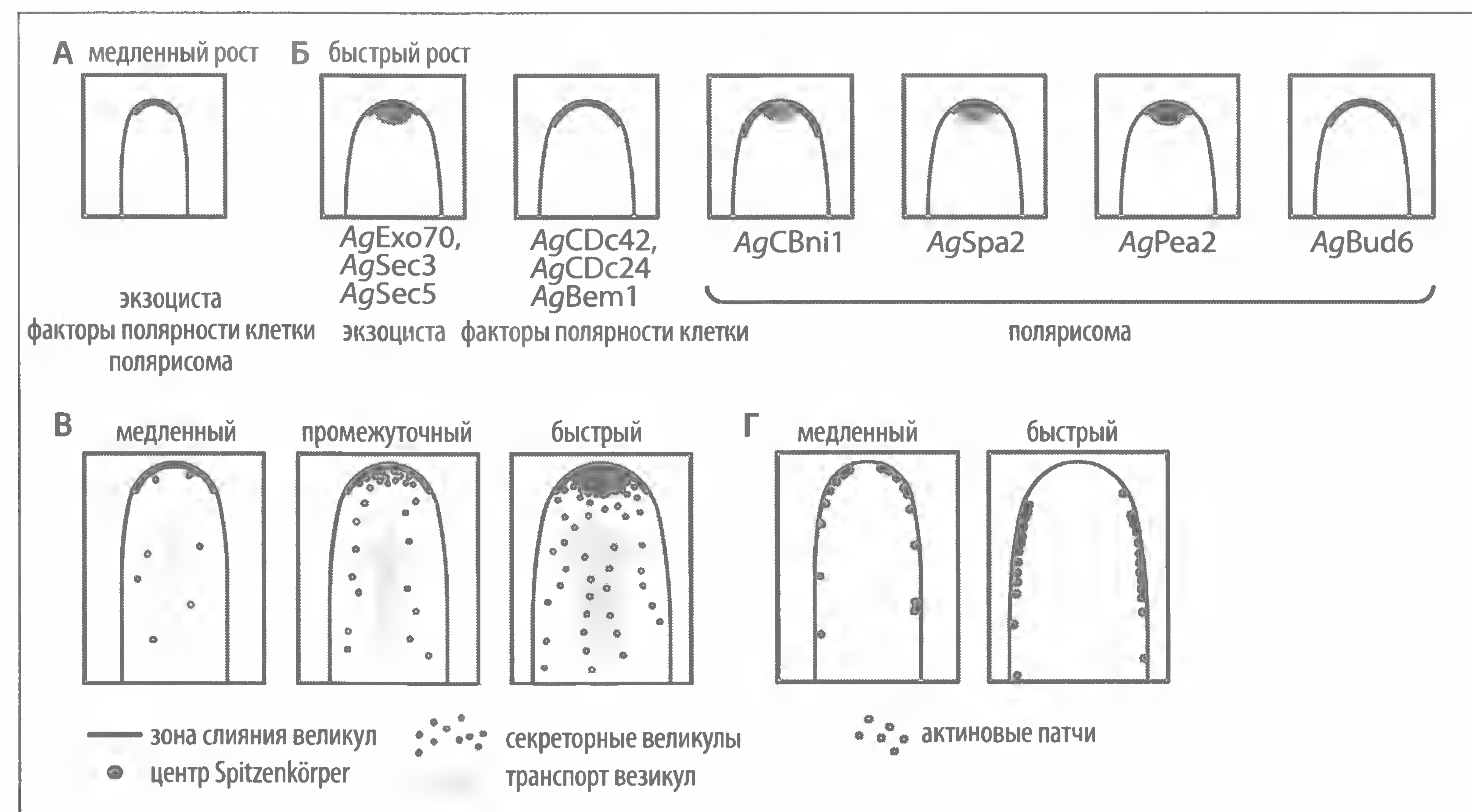


Рис. 34. Факторы поляризованного роста у *Ashbya gossypii*.

А. Медленно растущий кончик гифы, белки экзоцисты, полярисомы и других факторов полярности подписаны под рисунками.

Б. Локализация тех же белков, как и на рис. А у быстрорастущей гифы.

В. Модель формирования Spitzenkőrper Относительное количество транспортных везикул символически показано шириной фоновой серой стрелки.

Г Актиновые глобулы представляют места эндоцитоза в медленно- и быстрорастущей гифах (Köhli et al., 2008).



Рис. 35. Схема формирования гифы (1) и псевдогифы (2) у *Candida albicans* (Sudbery, 2011). Пояснения см. в тексте.

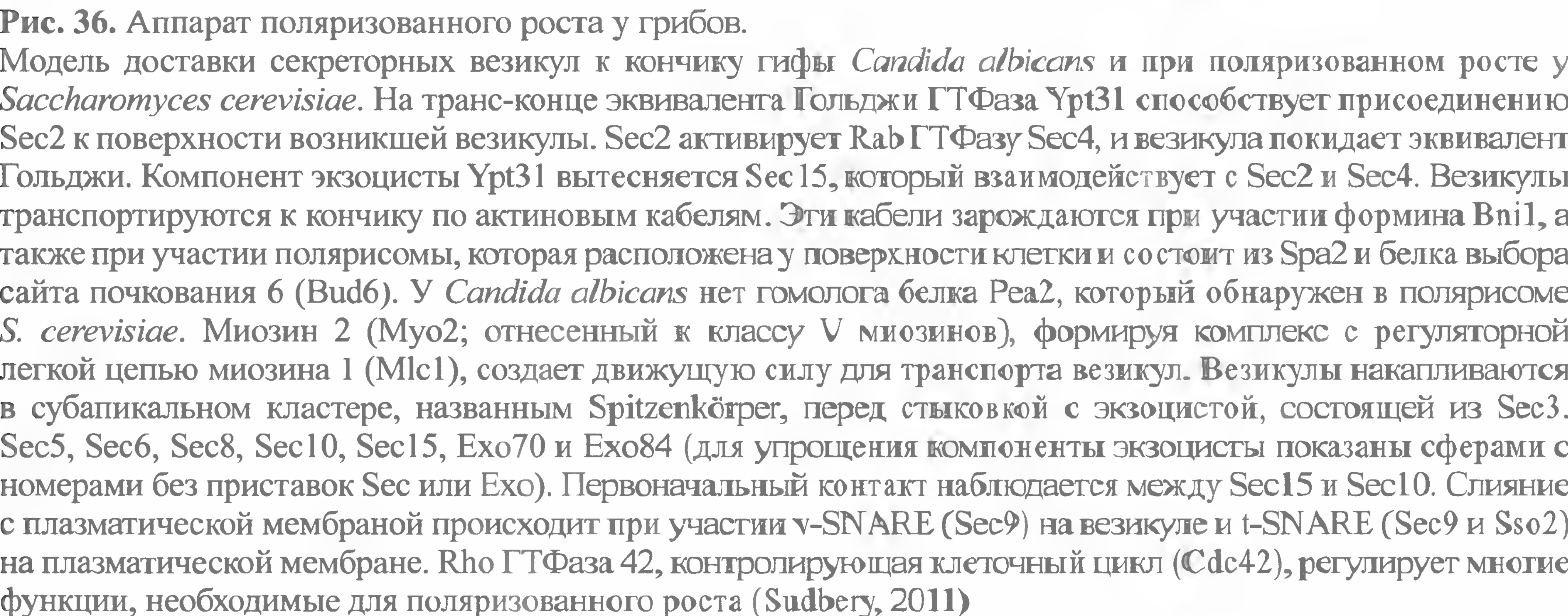


Рис. 36. Аппарат поляризованного роста у грибов.

Модель доставки секреторных везикул к кончику гифы *Candida albicans* и при поляризованном росте у *Saccharomyces cerevisiae*. На транс-конце эквивалента Гольджи ГТФаза Ypt31 способствует присоединению Sec2 к поверхности возникшей везикулы. Sec2 активирует Rab ГТФазу Sec4, и везикула покидает эквивалент Гольджи. Компонент экзоцисты Ypt31 вытесняется Sec15, который взаимодействует с Sec2 и Sec4. Везикулы транспортируются к кончику по актиновым кабелям. Эти кабели зарождаются при участии формина Bni1, а также при участии полярисомы, которая расположена у поверхности клетки и состоит из Spa2 и белка выбора сайта почкования 6 (Bud6). У *Candida albicans* нет гомолога белка Pea2, который обнаружен в полярисоме *S. cerevisiae*. Миозин 2 (Myo2; отнесенный к классу V миозинов), формируя комплекс с регуляторной легкой цепью миозина 1 (Mlc1), создает движущую силу для транспорта везикул. Везикулы накапливаются в субапикальном кластере, названным Spitzenkörper, перед стыковкой с экзоцистой, состоящей из Sec3. Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 и Exo84 (для упрощения компоненты экзоцисты показаны сферами с номерами без приставок Sec или Exo). Первоначальный контакт наблюдается между Sec15 и Sec10. Слияние с плазматической мембраной происходит при участии v-SNARE (Sec9) на везикуле и t-SNARE (Sec9 и Sso2) на плазматической мембране. Rho ГТФаза 42, контролирующая клеточный цикл (Cdc42), регулирует многие функции, необходимые для поляризованного роста (Sudbery, 2011)

альном росте септа формируется между материнской клеткой и дочерней. Во-вторых, митоз происходит в перешейке между материнской клеткой и дочерней почкой. В-третьих, после завершения клеточного цикла материнская клетка и дочерняя клетка-почка вступают сразу в новый клеточный цикл. У псевдогифы дочерняя клетка остается связанной с материнской клеткой, хотя прикрепление непрочное и быстро разрушается при механическом перемешивании в противоположность мицелиальному росту. Более того, во время псевдогифального роста цитокинез приводит к сужению соседних клеток в месте локализации септы. В результате формируется обильно ветвящаяся сеть сужающихся к септе клеток, в отличие от слабоветвящихся гиф мицелиальной колонии.

Поляризованный рост требует постоянного потока секреторных везикул к местам роста (рис. 36). Везикулы переносят материал мембраны, клеточной стенки и ферменты для синтеза новой клеточной стенки, что требуется для растяжения плазматической мембраны и клеточной стенки в местах роста. В процессе гифального роста поток секреторных везикул, который может быть виден при использовании GFP-Sec4, двигается к кончику гифы. Секреторные везикулы перемещаются по актиновым филаментам, которые поляризованы в направлении кончика. Формин Bni1, а также связанные с везикулами белки, такие как Sec4, Mlc1 и Sec2, накапливаются в виде сферического пятна на кончике гифы. Этот образец локализации везикул указывает на присутствие апикального тельца Spitzenkörper, что подтверждается окрашиванием стириловым красителем FM4-64, который выявляет апикальное тельце у мицелиальных грибов. Таким образом, Spitzenkörper выявляется как область цитоплазмы апикально растущей гифы, богатой везикулами путей экзо- и эндоцитоза. Апикальное тельце соответствует гипотетическому центру снабжения везикулами (ЦСВ, VSC, vesicle supply centre).

В отличие от Sec4, Mlc1 и Sec2, которые локализованы с предполагаемым Spitzenkörper, компоненты экзоцисты и полярисомы располагаются в виде полумесяца в кончике гифы. Компоненты экзоцисты могут быть связаны с везикулами Spitzenkörper (рис. 35). По прогнозу этой модели компоненты апикального тельца очень динамичны, как и поток прибывающих и исходящих везикул, в то время как компоненты полярисомы и экзоцисты более статичны. Эксперименты подтвердили, что компоненты экзоцисты менее динамичны, чем компоненты апикального тельца, но более динамичны, чем компоненты полярисомы. Это подтверждает факт, что компоненты экзоцисты переносятся к клеточной поверхности на везикулах, но не все везикулы переносят компоненты экзоцисты. При этом роль микротрубочек в процессе роста кончика гифы *C. albicans* неясна.

Актиновые патчи, которые маркируют места эндоцитоза, также поляризованы в направлении кончика. Эндоцитоз является важным для формирования гифы. Потребность в эндоцитозе может отражать необходимость возвращения материала мембраны, который встраивается в плазмалемму при слиянии секреторных везикул, или необходим для повторного использования мембранных белков, таких как v-SNAREs, переносимых секреторными везикулами и важных для дальнейшего цикла слияния везикул.

У *S. cerevisiae* Cdc42 и родственное семейство Rho ГТФаз контролируют поляризованный рост и морфогенез на многих уровнях, включая поляризацию актиновых нитей и патчей в местах поляризованного роста, формирование комплекса экзоцисты, стыковку секреторных везикул, формирование септинового кольца перед появлением почки и активацию МАРК модуля через Ste20 в процессе псевдогифального роста. У *C. albicans* Cdc42 и его фактор обмена гуаниловых нуклеотидов (GEF) Cdc24 локализованы в кончике гифы и необходимы для жизнеспособности гифы. Однако снижение экспрессии Cdc42 или Cdc24 исключает мицелиальный рост, но не дрожжевой. Мутант, у которого отсутствует один из белков, активируемых ГТФазой (GAPs), будет иметь псевдогифы. Rga2 фосфорилируется киназой Hgc1-Cdc28 в кончике гифы, что запускает механизм непрерывного роста гифы при участии специфичного гена (*HGC1*). Активация Cdc42 у *S. cerevisiae* зависит от Cdc24, а также от другого ГТФазного белка Rsr1, родственного Ras белкам, его GEF белка 5 сайта

выбора почкования (Bud5) и его GAP Bud2. Мутанты *C. albicans* с отсутствующим белком Rsr1 или Bud2 формируют гифы, которые шире гиф дикого типа и неспособны поддерживать направление роста. Эти мутанты также дефектны по направленному росту гифы, показывая полное отсутствие *тигмотаксиса* (ориентация по тактильным раздражениям при соприкосновении с субстратом) и *гальванотропизма* (способность мицелия реагировать изменением направления роста на электрический ток). Две другие ГТФазы Rho семейства принимают также участие в росте гифы. Белок Rho3 необходим для полимеризации актина и поляризованного роста, белки Rac1 и Dck1 необходимы для роста гифы при погружении в субстрат.

Поляризованный рост гифы *C. albicans* продолжается на протяжении всего клеточного цикла, в отличие от роста в виде дрожжей или псевдогиф, для которых характерны смены образцов роста — поляризованного и изотропного. Гифы характеризуются поляризованным актиновым цитоскелетом, присутствием полярисомы и Spitzenkörper. Для псевдогифальных клеток-почек характерна протяженная фаза G_2 клеточного цикла, отвечающая, вероятно, за продолжительный поляризованный рост.

4.5. Модели морфогенеза гифы и Spitzenkörper

Понимание механизмов роста гифы грибов — главная проблема биологии грибной клетки. Модель роста гифы должна учитывать фактор присутствия тургорного давления и возможность добавления нового материала плазмалеммы и клеточной стенки без повреждения/взрыва гифы.

Гифальная система оомицетов отличается от настоящих грибов, так как в ней отсутствует тургорное давление. Изменение осмотической составляющей среды никак не отражается на способности к поляризованному росту представителей Oomycota (в частности *Achlya bisexualis* и *Saprolegnia ferax*). Во многих отношениях растяжение гифы у представителей Oomycota подобно растяжению псевдоподий у клеток животных. В этом процессе в отсутствие тургора полимеризация актиновой сети цитоскелета у апекса гифы является главной движущей силой растяжения. Наиболее приемлемая модель роста для грибоподобных протистов (Oomycota) рассматривает растяжение кончика гифы при участии периферической сети F-актина, прикрепленной к плазмалемме и клеточной стенке с помощью белков *интегринов*.

Для объяснения механизма растяжения кончика гифы у мицелиальных грибов предложено несколько моделей, построенных на разных морфогенетических критериях. Две основные модели рассматривают клеточную стенку кончика гифы, как результат слияния с плазматической мембраной везикул, несущих предшественники клеточной стенки и ферменты, в частности хитинсинтазу (везикулы называют хитосомами). В настоящее время наиболее убедительное объяснение роста гифы обеспечивается интегральной моделью (III), объединяющей две другие модели: «vesicle supply center» модели S. Bartnicki-Garcia (I) и «steady-state» модели Y.G. Wessels (II).

Рассмотрим эти модели.

I. **Гифоидная модель** Bartnicki-Garcia предполагает присутствие центра снабжения везикулами (ЦСВ) у апекса гифы, который служит для распределения везикул, содержащих элементы плазматической мембраны и клеточной стенки (рис. 37А). Spitzenkörper является структурным эквивалентом ЦСВ, так как он расположен в месте ожидаемой локализации ЦСВ. Апикальная сеть микрофиламентов и микротрубочек вовлечена в транспорт везикул к финальному месту назначения. В этом контексте апикальное тельце может быть воспринято, как станция переключения, где микротрубочковый транспорт изменяется на микрофиламентный. У апекса сливается гораздо больше везикул на единицу площади в единицу

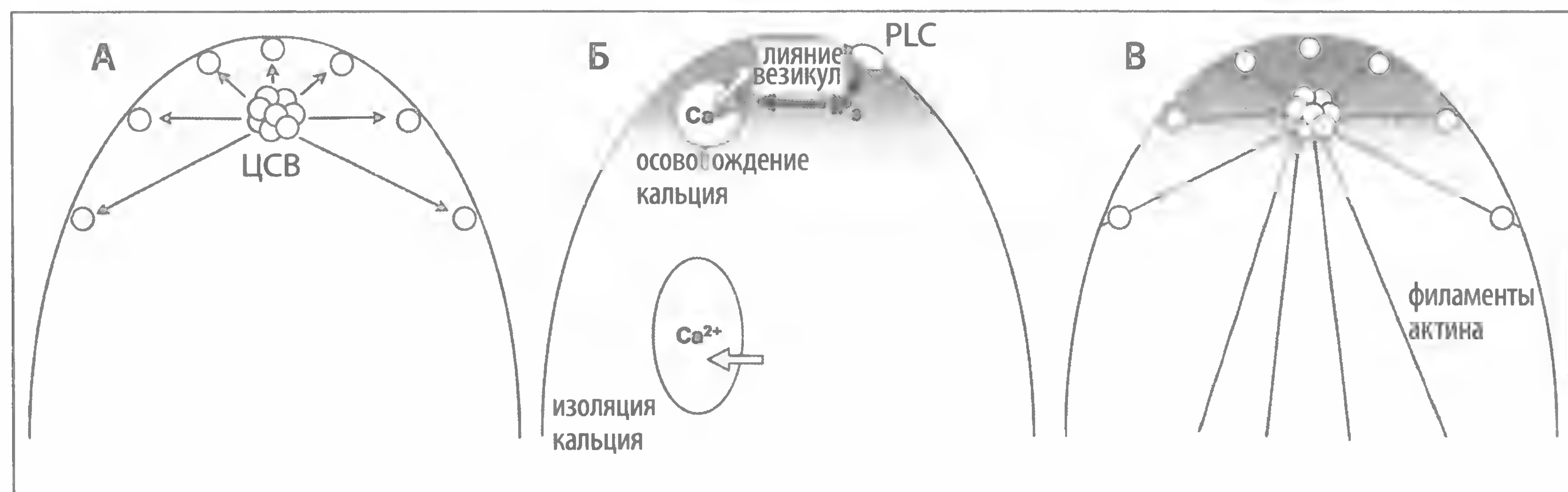


Рис. 37. Модели морфогенеза гифы.
А. Модель ЦСВ (центра снабжения везикулами). Везикулы распространяются случайно от ЦСВ к месту финального назначения на плазматической мембране. ЦСВ — эквивалент Spitzenkörper.
Б. Кальциевая модель. Активированная растяжением мембраны фосфолипаза С образует сигнальные молекулы IP они связываются с рецепторами кальций-содержащих везикул и способствуют освобождению Ca в апикальном районе. На значительном расстоянии от кончика кальций удаляется, создавая высокий градиент кальция на кончике. Высокая концентрация Ca2 способствует слиянию везикул с плазматической мембраной, приводя к высокой скорости слияния на кончике. Обозначения: PLC — фосфолипаза С, IP — инозитол трифосфат, R — рецептор IP Серый цвет показывает градиент кальция. Более темный цвет соответствует более высокой концентрации.
В. Актиновая модель. Эта модель интегрирует предыдущие две модели, она дополнена функцией актина (кортикального и кабелей актина) в росте кончика гифы и поддержании Spitzenkörper (Virag, Harris, 2006).

времени, чем в субапикальных районах. Базируясь на модели I, полагают, что Spitzenkörper принимает образующиеся в аппарате Гольджи везикулы. Важный аспект этой модели перемещение Spitzenkörper вперед, что, по-видимому, определяет направление и скорость роста гифы. Однако механизм этой предполагаемой подвижности Spitzenkörper неизвестен. Spitzenkörper содержит рибосомы, это позволяет предположить, что в апексе гифы происходит трансляция РНК и синтез белка. Аппарат Гольджи обильно представлен в кончике гифы и концентрируется в апикальном районе на расстоянии 5–10 мкм от кончика. Цистерны эндоплазматического ретикулума также накапливаются около апекса гифы, что подтверждает поляризованный синтез белка для поддержания роста кончика гифы.

В гифоидной модели скорость добавления компонентов к любой части стенки зависит от расстояния до автономно двигающегося ЦСВ, который предположительно представлен Spitzenkörper. Гифоидная модель предполагает, что везикулы, транспортирующие компоненты клеточной стенки, распространяются от организующего центра ЦСВ радиально к поверхности гифы во всех направлениях случайным образом. Везикулы содержат помимо структурных компонентов литические ферменты (эндоглюканазы, возможно, хитиназы), которые участвуют в гидролизе молекул структурного глюкана в существующей стенке. Растяжение клеточной стенки растягивает расщепленные молекулы в разные стороны. Ресинтез происходит путем встраивания олигоглюканов.

Ресинтезируемые молекулы клеточной стенки имеют такую же механическую прочность, как и раньше, но они стали длиннее, а кончик гифы вырос. Миграция вперед ЦСВ обеспечивает гифоидную форму. Компьютерное моделирование продемонстрировало влияние положения и движения ЦСВ на морфогенез грибной клетки. Модель отражает наблюдения, сделанные на живых гифах, и предсказывает результаты, которые постепенно подтверждаются, делая гифоидную модель правдоподобной гипотезой, объясняющей морфогенез гифы.

II. **Модель устойчивого состояния («steady-state»)** синтеза клеточной стенки или модель **'мягкого пятна'** предполагает, что тургорное давление внутри клетки вносит основной вклад в растяжение клеточной стенки на кончике гифы, где она еще пластичная. Везикулы с материалом клеточной стенки сливаются с мембраной в этой точке роста. Новый материал клеточной стенки будет иметь приоритет в последовательном включении в недавно синтезируемую стенку и это обеспечивает «устойчивое состояние», которое и дало название этой модели.

Согласно модели II, фибриллы клеточной стенки, такие как цепи хитина или глюкана, синтезируются у апекса гифы. В апексе эти фибриллы еще не связаны поперечными связями, и стенка остается гибкой. Апикальный кончик вытягивается, а субапикальный хитин кристаллизуется и формирует ковалентные связи с β-1,3-глюканами, что приводит к затвердеванию клеточной стенки в удаленных от кончика (субапикальных и далее) частях растущей гифы (рис. 38). В этой модели участие литических ферментов предполагается только для инициации роста клеточной стенки, но не поддержания его.

Тургорное давление цитоплазмы растягивает тонкую пластичную клеточную стенку, впоследствии она утолщается и достраивается/реставрируется везикулярным экзоцитозом белков

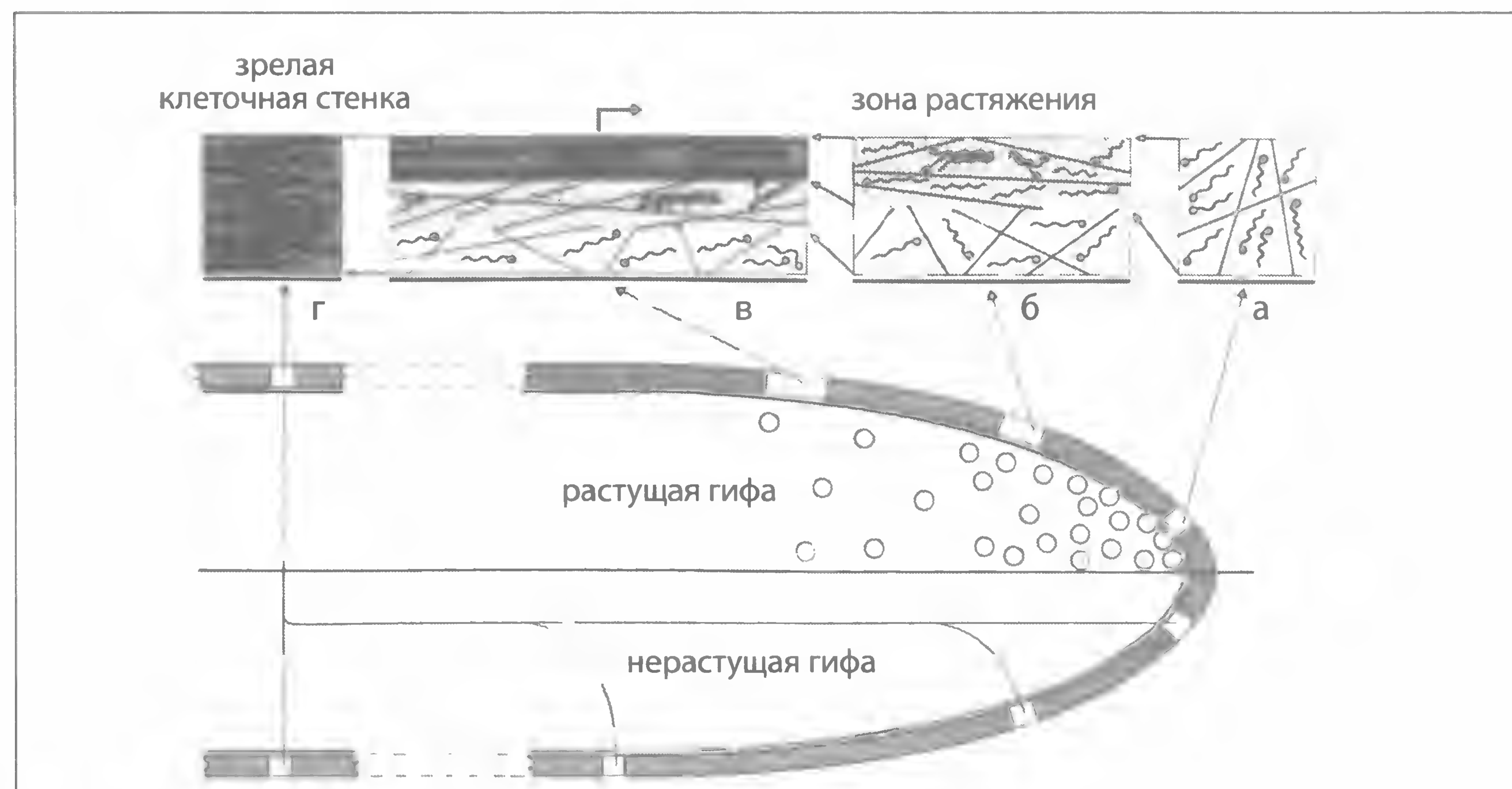


Рис. 38. Модель апикального роста «steady-state». Вновь синтезированная стенка состоит из цепей хитина (прямые линии) и (1→3)-β-глюкана (волнистые линии). Другие компоненты стенки опущены, так как они менее важны как структурные элементы. Со временем эти два полимера взаимодействуют и образуют хитиновые микрофибриллы и тройные спирали β-глюкана, в то же время хитин связывается с β-глюкановыми цепями, которые могут ветвиться. На самом кончике (а) стенка минимальной толщины и наиболее пластичная. В субапикальной области (б) происходит увеличение плотности стенки, добавляемый материал встраивается при растяжении и частично связывается поперечными связями (увеличение затемнения), новый материал стенки добавляется с внутренней стороны для обеспечения необходимой толщины стенки На (в) формирующиеся поперечные связи создают жесткость для сопротивления тургорному давлению, но это еще не максимальная прочность. Формирование поперечных связей продолжается в трубчатой части стенки далеко позади кончика (г). В нерастущей части (везикул нет) происходит нарушение установившегося баланса роста и синтеза стенки, так как количество эластичного материала стенки не выталкивается больше в зону затвердевания. Поперечные связи между стеночными полимерами занимают весь объем стенки (Wessels, 1993).

и полисахаридов, а также их предшественников. Целевое предпочтительное включение этих везикул в сравнительно недавно синтезированную стенку означает, что, однажды возникнув, растущая точка будет сохранена (снова устойчивое состояние). Предварительное разрыхление для образования пластичной стенки достигается через эндолитическое расщепление, хотя у этой модели подобная энзиматическая активность работает кратковременно только для инициации роста. Растяжение стенки и добавление нового материала стенки со стороны цитоплазмы происходит максимально на самом кончике. Новый добавляемый материал — это хитин и молекулы $\beta(1\rightarrow3)$-глюкана. Со временем эти два полимера образуют поперечные связи между собой и белками клеточной стенки и образуют трехмерную структуру (см. главу 2).

Итак, на самом кончике стенка гифы наиболее пластична и имеет минимальное количество поперечных связей. Количество поперечно связанных полимеров клеточной стенки прогрессивно увеличивается от кончика к основанию гифы и, так как стенка «затвердевает», чтобы противостоять тургорному давлению и растяжению, синтетическая активность ее снижается. Если кончик перестает растягиваться по какой-либо причине (например, изменение тургора), устойчивое состояние нарушается, образуются поперечные связи между полимерами, которые распространяются в апикальном кончике.

Чтобы выйти из этого остановившегося состояния, необходим свежий цикл эндолитического расщепления для начала растяжения кончика гифы.

III. **Интегральная модель (consensus model of tip extension),** объединяет две первые модели. Она учитывает активность хитинсинтазы, вклад градиента везикул в комбинации с другими компонентами двух первых моделей.

Модель III растяжения кончика гифы предполагает сходство клеток животных и грибов в наличии элементов внутриклеточного цитоскелета, которые пронизывают мембрану и сохраняют жесткую структуру натяжения клеточной стенки, пока мембранные белки модифицируют ее структуру. Это (интегрин-опосредованное) прикрепление к внеклеточному матриксу стенки у апекса гифы ('wall contacts') обеспечивает связь актинового цитоскелета через плазматическую мембрану с компонентами стенки. Такие контакты со стенкой должны быть специфичны для разных компонентов стенки или даже отдельных молекул компонентов стенки. Контакты со стенкой, по-видимому, обеспечивают:

- ✓ Дополнительную механическую прочность стенки для компенсации ее размягчения из-за ферментативного расщепления компонентов стенки в связи с включением нового материала;
- ✓ Контроль механического натяжения, который может далее регулировать ферментативную активность или модулировать поток везикул к локальным местам;
- ✓ Детекторы обратной связи, определяющие ход синтеза стенки. В этом отношении необходимо заметить, что у животных связь между интегринами и внеклеточным матриксом генерирует сигналы, которые вызывают фосфорилирование внутриклеточных путей сигнальной трансдукции. Это известно как 'outside-in signalling'. Подобный механизм будет способствовать прогрессу синтеза клеточной стенки и предоставлять везикулы для синтеза в необходимом для роста количестве;
- ✓ Регуляцию везикулярного транспорта; близкие к мембране актиновые филаменты будут направлять везикулы с большей специфичностью в ответ на внешние сигналы; более отдаленные филаменты будут сортировать и собирать везикулы в запасные пути.

Очевидно, во всех этих моделях имеется утверждение, что растяжение гифы поддерживается постоянным направленным вперед потоком строительных материалов, генерируемых в цитоплазме позади кончика гифы. Строительные материалы поступают из ЭР, проходят через цистерны Гольджи и в везикулах транспортируются в растущий кончик (рис. 39).

Для поддержания максимальной скорости роста гифы *N. crassa* необходимо слияние с апикальной мембраной каждую минуту 38000 везикул. Доставка везикул обеспечивается системой моторных белков и элементов цитоскелета. Вполне возможно, что в снабжении необходимым материалом для роста гифы участвуют подвижные вакуоли (крупнее апи-

кальных везикул), которые быстро перемещаются вдоль гифы к кончику клетки и могут использовать свое содержимое для апикального растяжения. Итак, имеется чрезвычайно оживленный, направленный вперед поток материалов в апекс гифы.

Имеется еще две дополнительные модели апикального роста гифы грибов. Одна из них подчеркивает роль градиента Ca^{2+} в кончике гифы (рис. 37Б). Основа этой модели — значение для апикального роста высокой концентрации кальция в цитоплазме и мембранах апекса гифы. При нарушении градиента кальция апикальный рост нарушается, что приводит к формированию множественных кончиков или к полной потере полярности. Согласно этой модели, активируемая растяжением фосфолипаза С, стимулирует образование инозитолтрифосфата (IP_3), который затем связывается с рецептором IP_3 на поверхности множества кальций-содержащих везикул. Локальное увеличение свободного Ca^{2+} облегчает слияние везикул с плазматической мембраной. Максимальное слияние происходит в местах с высокой концентрацией Ca^{2+}. Хотя эта модель не спорит с присутствием Spitzenkörper на кончике гифы и не обсуждает роль Spitzenkörper, она дает альтернативный механизм транспорта везикул к местам включения в плазматическую мембрану.

Другая модель интегрирует предшествующие модели и делает акцент на роли актина в кончике гифы. Эта модель подчеркивает двойную роль актиновых филаментов в растущем кончике гифы (рис. 37В). Модель была создана при сравнении морфогенеза гифы и распространения актина у дикого типа и мутанта по актину *N. crassa*. Было показано, что микрофиламенты актина контролируют скорость транспорта везикул к кончику. Делая это, они вносят вклад в значение градиента кальция. С другой стороны, филаменты актина, по-видимому, вовлечены в удержание Spitzenkörper в районе роста вблизи плазматической мембраны и клеточной стенки. У мутантного по актину штамма нарушено положение Spitzenkörper, что отражается на морфологии и росте гифы.

Представленные выше модели роста гифы созданы для лучшего понимания процесса поляризованного роста мицелиальных грибов. Однако к настоящему времени еще нет модели, которая бы представила сложный процесс поляризованного роста гифы с учетом всех структурных и регуляторных компонентов, а также способа их координации на клеточном уровне. Отсутствие подобной модели связано с недостатком знаний состава, сборки и разборки апикального тельца, процессов регуляции его функционирования, связи между структурными компонентами полярности исследуемых комплексов, таких как полярисома, Spitzenkörper и др., которые необходимы для понимания механизмов, лежащих в основе морфогенеза гифы.

Исследования на грибах из разных таксономических групп (*A. nidulans*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*) показали, что цитоплазматическая мембрана грибов в местах роста гифы обогащена стеринами, что впервые было показано для клеток животных (аксоны и клетки эпителия). Стерин-содержащие домены в точках роста гиф грибов могут участвовать в апикальном эндоцитозе и закреплении F-актина в точках роста.

4.6. Современные представления о поляризованном росте мицелиальных грибов

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать следующее заключение: рост кончика гифы является характерной чертой мицелиальных грибов. Достижения в области клеточной биологии грибов позволили составить представление о комплексном и многофакторном механизме роста кончика гифы (рис. 39). В нем участвуют следующие структуры и факторы полярности:

✓ Апикальное тельце Spitzenkorper, в состав которого входят везикулы, рибосомы;

✓ Аппарат Гольджи, поставляющий секреторные везикулы с материалом для синтеза мембраны и клеточной стенки;

✓ Цитоскелет (F-актин, микротрубочки) и моторные белки (миозины классов 1, 5, 17, кинезины классов 1, 3, 7).

✓ Полярисома и ее компоненты. Формины, например, способствуют полимеризации актина и закреплению плюс концов нитей актина растущего кончика;

✓ Богатые стеринами домены цитоплазматической мембраны функционируют в качестве посредника полярисомы на кончике гифы.

Литература

Araujo-Palomares C.L., Riquelme M., Castro-Longoria E. 2009. The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkörper // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. No.8. P.551–563.

Bartnicki-Garcia S. 2002. [Hyphal tip growth: outstanding questions] // H.D. Osiewacz (ed). Molecular biology of fungal development. New York: Marcel Dekker. P. 29–58.

Boyce K.J., Andrianopoulos A. 2006. [Morphogenesis: control of cell types and shape. 1] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P.1–7.

Brunswick H. 1924. Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhaltnisse bei der Hymenomyzetengattung *Coprinus*. Bot. Abhandl. Herausgeg. V. Jena : G. Fischer. 152 S.

Fischer R. 2007. [The cytoskeleton and polarized growth of filamentous Fungi. 5] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition. The Mycota VIII. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.121–135.

Fischer-Parton S., Parton R.M., Hickey P.C., Dijksterhuis J., Atkinson H.A., Read N.D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae // J. Microsc. Vol.198. P.246–259.

Girbardt M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* // Planta. Vol.50. P.47–50.

Gladfelter A.S. 2006. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins // Nature Reviews Microbiolog. Vol.4. P.223–229.

Grove S.N., Bracker C.E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: Vesicles and Spitzenkörper // Journal of Bacteriology. Vol.104. No.2. P.989–1009.

Harris S.D., Momany M. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. Review // Fungal Genetics and Biology. Vol.41. P.391–400.

Harris S.D., Read N.D., Roberson R.W., Shaw B., Seiler S., Plamann M., Momany M. 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy genetics, and genomics converge. Minireviews // Eukaryotic Cell. Vol.4. No.2. P.225–229.

Heath I.B., van Rensburg E.J.J. 1996. Critical evaluation of the VSC model for tip growth // Mycoscience. Vol.37. P.71–80.

Köhli M., Galati V., Boudier K., Roberson R., Philippsen P. 2008. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips // Journal of Cell Science. Vol.121. No.23. P.3878–3889.

Lichius A., Yáñez-Gutiérrez M.E., Read N.D., Castro-Longoria E. 2012. Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome // PLoS ONE. Vol.7. No.1. P.1–23.

López-Franco R., Bracker C.E. 1996. Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi // Protoplasma. Vol.195. P.90–111.

Momany M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes // Current Opinion in Microbiology. Vol.5. P.580–585.

Moore D. 1998. Fungal Morphogenesis. New York: Cambridge University. Chapter 2. P. 26–71.

Sietsma J.H., Wessels J.G.H. 2006. [Apical Wall Biogenesis. 4] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.53–71.

Steinberg G. 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. Minireview // Eukaryotic cell. Vol.6. No.3. P.351–360.

Sudbery P. 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae // Nature reviews Microbiology. Vol.9. P.737–748.

Sudbery P., Court H. 2007. [Polarised Growth in Fungi 6] // Biology of the Fungal Cell, 2nd Edition The Mycota VIII R.J. Howard and N.A.R. Gow (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P. 137–166.

Sugden K.E.P., Evans M.R., Poon W.C.K., Read N.D. 2007. Model of hyphal tip growth involving microtubule-based transport // Phys. Rev. E Stat Nonlin Soft Matter Phys. Mar. 75(3 Pt 1):031909.

Taheri-Talesh N., Horio T., Araujo-Bazán L., Dou X., Espeso E.A., Peñalva M.A., Osmani S.A., Oakley B.R. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans* // Molecular Biology of the Cell. Vol.19. P.1439–1449.

Torralba S., Heath I.B., Ottensmeyer F.P. 2001. Ca^{2+} Shuttling in vesicles during tip growth in *Neurospora crassa* // Fungal Genetics and Biology. Vol.33. P.181–193.

Virag A., Harris S.D. 2006. The Spitzenkörper: a molecular perspective. Review // Mycological research. Vol.110. P.4–13.

Wessels J.G. 1993. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi // New phytology. Vol.123. P.397–413.

Глава 5.
Цитоскелет грибной клетки[1]

Цитоскелет у грибов играет роль во множестве клеточных функций, таких как регуляция полярности клетки, эндоцитоз и экзоцитоз, митоз и мейоз, септирование и внутриклеточный транспорт органелл.

Цитоскелет грибной клетки представлен микротрубочками, филаментами актина в комбинации с моторными белками и промежуточными филаментами септина.

5.1. Микротрубочковый цитоскелет

5.1.1. Структура и нуклеация (зарождение) микротрубочек

Микротрубочки (МТ) — это полые цилиндрические структуры диаметром 25 нм, которые собираются из α-тубулина-β-тубулина (αβ-тубулин) — гетеродимеров субъединиц глобулярного тубулина при участии ГТФ (рис. 40). Тубулиновые субъединицы создают два типа контактов в филаментах: продольные и боковые. Продольные контакты по длине микротрубочек формируют протофиламенты (обычно α-тубулин с α-тубулином и β-тубулин с β-тубулином) (рис. 40а). Благодаря боковым α-тубулин-β-тубулин взаимодействиям (более слабым, чем α-тубулин-α-тубулин или β-тубулин-β-тубулин боковым контактам) образуется симметричная спираль. Так как микротрубочки формируются путем соединения концов альфа/бета димеров, их структура

---

[1] Сокращения

ГТФ — гуанозинтрифосфат

МТ — микротрубочки цитоскелета

ПТВ (англ. spindle pole body, **SPB**) — полярное тельце веретена

ЦОМТ — центр организации микротрубочек

ЦСВ (англ. vesicle supply centre, **VSC**) — центр снабжения везикулами

ЭР — эндоплахматический ретикулум

Arp2/3 — белковый комплекс, состоящий из семи доменов, который играет главную роль в регуляции актинового цитоскелета.

ABPs (actin-binding proteins) — связанные с актином белки

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) — флуоресцентный краситель, который связывается с А-Т богатыми регионами ДНК.

FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching — обнаружение по флуоресценции после фотооблучения.

G_1, G_2 — стадии интерфазы клеточного цикла: G_1-фаза (от англ.*gap* — промежуток), или фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов: G_2-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.

GFP (англ. green fluorescent protein) — зеленый флуоресцентный белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его синим светом.

MAPs (англ. microtubuls-associated proteins) — структурные белки, которые участвуют непосредственно в процессе сборки микротрубочек, регулируют критические стадии процессов сборки, а также осуществляют связь микротрубочек и других клеточных компонентов.

γ-TuRC — инициаторный белковый комплекс, откуда возникает 13 тубулиновых протофиламентов

поляризована. Полимеризация происходит с разной скоростью на двух концах, значительно быстрее при наличии затравки на конце со свободной альфа-субъединицей, который называется плюс концом (рис. 40б). Необычным свойством сборки микротрубочек в клетке *in vivo* является то, что обеспечивается геометрия из 13 протофиламентов. Как это происходит, долгое время оставалось загадкой, пока не был изучен механизм инициации образования микротрубочек.

Функцию инициации образования микротрубочек у эукариот выполняет центр организации микротрубочек (ЦОМТ, англ. MTOC), у грибов эту роль обычно играет *полярное тельце веретена* (ПТВ, англ. spindle pole body, SPB, подробнее см. в разделе «Ядро. Митоз. Мейоз»), компонентом которого является γ-тубулин (или γ-tubulin ring complex, γ-TuRC), гомолог альфа-тубулина и бета-тубулина. γ-Тубулин высших и, вероятно, низших эукариот является кольцевым протеиновым комплексом, состоящим из 13 γ-тубулиновых субъединиц, связанных с другими белками. γ-TuRC действует как инициаторный комплекс, откуда возникает 13 тубулиновых протофиламентов (рис. 41).

Центры организации микротрубочек у грибов могут быть локализованы в разных компартментах клетки: около ядерной оболочки, около септ, у апекса и в цитоплазме. В клетках животных большинство комплексов γTuRC (80%) находится в растворенном состоянии в цитоплазме. Однако способность к нуклеации γTuRC, по-видимому, ограничена специфическими местами в клетке, такими как полюса веретена деления.

У почкующихся дрожжей единственным центром организации микротрубочек является ПТВ, представляющее собой крупную многослойную структуру, содержащую γ-тубулин. В интерфазе ПТВ встроено в ядерную оболочку и является центром образования небольшого числа цитоплазматических микротрубочек у *Saccharomyces cerevisiae* и значительного количества МТ у мицелиальных грибов. Цитоплазматические МТ у *S. cerevisiae* определяют положение ядра перед делением. Перед митозом оно делится и локализуется на полюсах будущего митотического веретена деления. В процессе митоза формируются внутриядерные микротрубочки, образующие веретено деления, и наружные или астральные МТ.

Долгое время полагали, что ПТВ являются единственным местом для инициации МТ. Однако, исследования на делящихся дрожжах *Schizosacharomyces pombe* показали, что МТ образуются не только из ПТВ, но и из других центров, которые возникают в цитоплазме на определенных стадиях жизненного цикла: в конце митоза появляется ЦОМТ в месте деления ядра, при половом процессе — на кончике клетки. Анализ инициации МТ у патогена растений базидиомицета *Ustilago maydis* выявил, что у дрожжевой формы диморфного гриба *U. maydis* на разных стадиях жизненного цикла имеется три центра образования МТ: в двух полярно расположенных дисперсных участках цитоплазмы и в ПТВ (рис. 42).

У мицелиальных грибов наше знание о центрах организации МТ ограничено несколькими видами: хитридиомицетом *Allomyces macrogynus*, базидиомицетом *U. maydis*, и лучше всего исследованным в этом отношении аскомицетом *Aspergillus nidulans*. ЦОМТ у *A. nidulans* были обнаружены в ПТВ, в цитоплазме и около септы (рис. 43). ЦОМТ у септы имеет значение для формирования цитоплазматического пучка МТ (рис. 43Д). Дополнительным местом локализации ЦОМТ у мицелиальных грибов является кончик гифы. γ-Тубулин обнаружен к настоящему времени на кончике гифы у хитридиомицета *A. macrogynus,* он участвует в полимеризации МТ от кончика гифы к септе.

Перемещение микротрубочек в клетке происходит в результате одновременного наращивания одного конца и диссоциации другого конца микротрубочек. Этот процесс характерен и для сборки филаментов актина (см. ниже) и назван «тредмиллинг».

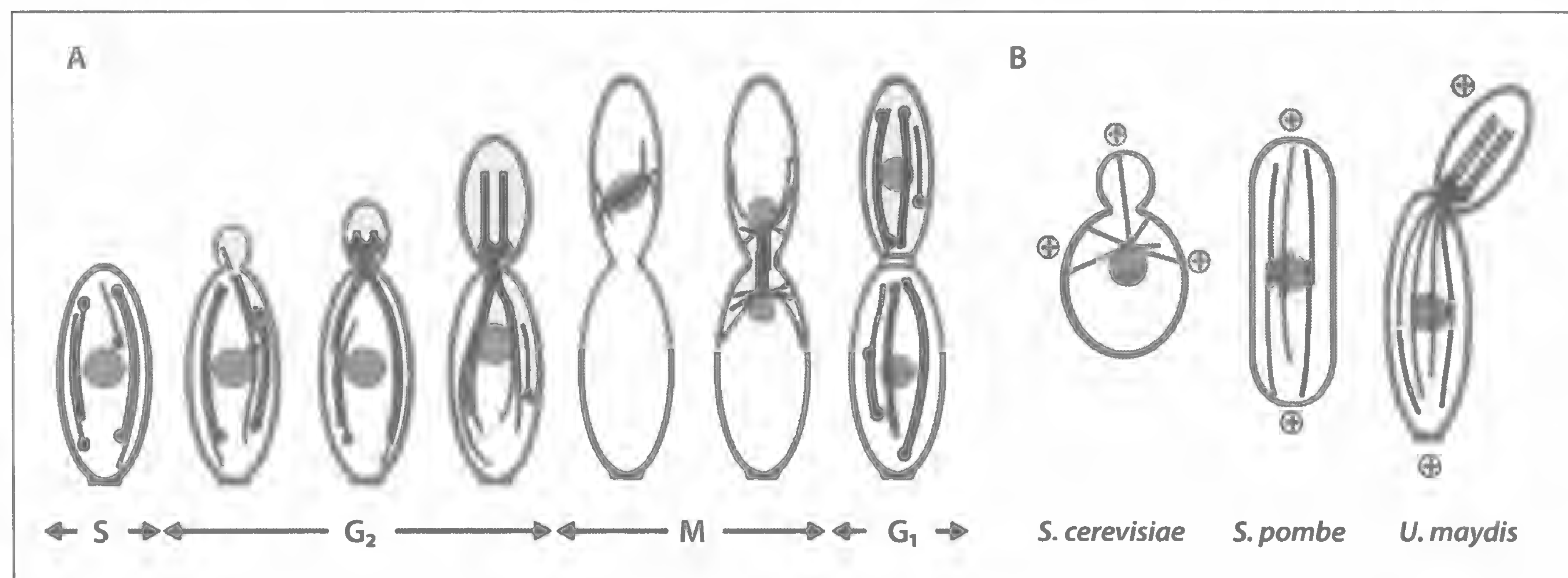


Рис. 42. Положение микротрубочек (МТ) в клеточном цикле *Ustilago maydis* и интерфазе у разных дрожжеподобных клеток (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *U. maydis*).
А. Пучки МТ проходят по всей длине клетки *U. maydis* и содержат антиполярно-ориентированные МТ в процессе фаз G_1 и S Микротрубочки берут начало от ядерно-цитоплазматических центров. Поляризация МТ цитоскелета встречается в фазе G_2, когда длина почки достигает ~15% от длины материнской клетки. МТ берут начало и прикрепляются на полюсе ЦОМТ в перешейке почки. С началом митоза ПТВ становится центром организации МТ. Обозначения: места образования МТ нарисованы черными овалами, ядра серым, МТ черным. Стадии клеточного цикла отмечены снизу.
В. У *Saccharomyces cerevisiae* интерфазные МТ происходят от ПТВ с плюс-концами, обращенными к кортексу. Интерфазные МТ цитоскелета *Schizosaccharomyces pombe* организованы множественными ЦОМТ, локализованными около ядра, в то же время ПТВ неактивны. Плюс-концы МТ растут по направлению к полюсам клетки и положение ядра в центре клетки сбалансировано их натяжением со стороны обоих полюсов клетки. Организация МТ у *U maydis* в фазу G_2 характеризуется полярным ЦОМТ около шейки почки; минус-концы МТ обращены в шею, плюс-концы — в почку и материнскую клетку. ПТВ неактивно в интерфазе. Обозначения: ядра серые, МТ черные, ЦОМТ черный. Плюс концы МТ помечены крестиками (Straube et al., 2003).

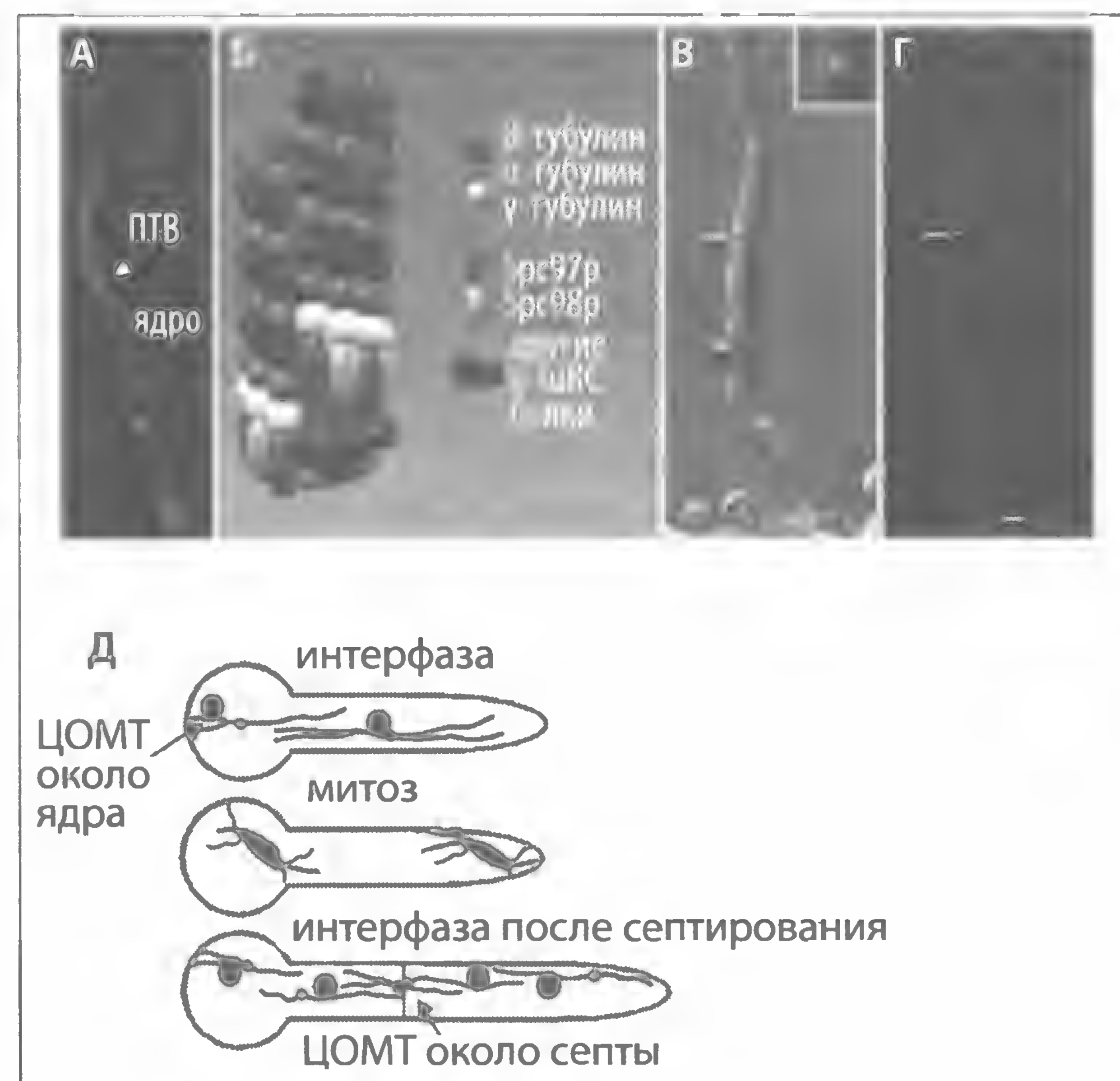


Рис. 43. Центры организации микрорубочек (ЦОМТ) у *Aspergillus nidulans*.
А. Гифа с окрашенными DAPI ядрами и GFP-меченное ПТВ, ассоциированное с ApsB. У равномерно светящихся ядер видны ПТВ. Б. Модель ЦОМТ с γ-тубулином и другими белками, описанными у *Saccharomyces cerevisiae*. В–Г — локализация ЦОМТ в районе септы: Д. ЦОМТ обнаружены около ядер, в цитоплазме и у септы. В — фазовый контраст, Г — флуоресценция ApsB, маркированного GFP (Fischer 2007).

5.1.2. Функции МТ и распределение в клетке грибов

Микротрубочки образуют веретено деления ядра, необходимы для транспорта разных органелл грузов и имеют значение для поляризованного роста мицелиальных грибов

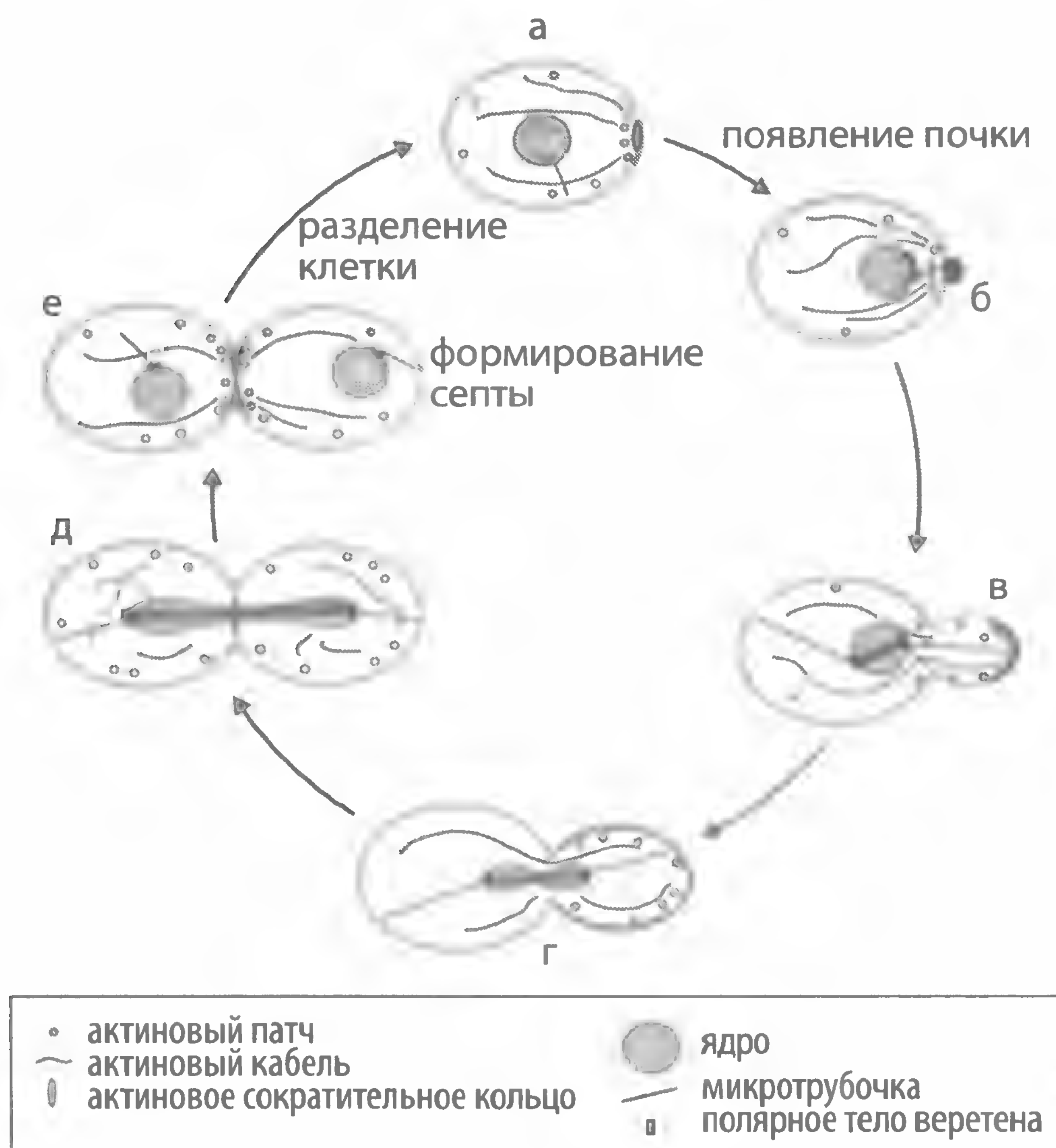


Рис. 44. Распределение микротрубочек и актина в процессе клеточного цикла у *Saccharomyces cerevisiae*.
а Микрофиламенты актина локализованы в месте появления почки под клеточной стенкой Секреторные везикулы и миозин V образуют уплотнение, которое маркирует место появления почки Немногочисленные короткие микротрубочки в интерфазу отходят от полярных тел веретена.
б. Секреторные везикулы сливаются с плазматической мембраной и освобождают предположительно размягчающие клеточную стенку ферменты, что позволяет тургорному давлению проложить дорогу для почки. Место появления почки окружено глобулами и микрофиламентами кортикального актина. Вначале рост почки поляризован.
в-г. Когда размер почки достигает критического объема цитоплазмы, рост становится изотропным.
На стадиях в-г микрофиламенты поляризованного актина пересекают материнскую клетку. Некоторые микрофиламенты подходят к шее почки, в то время как другие пересекают шею почки и саму почку.
На протяжении всего клеточного цикла актиновые глобулы появляются там, где имеет место секреция. От момента появления почки (б) до середины стадии почкования (в) ядра в большинстве клеток лежат близко к шее почки благодаря прикреплению цитоплазматическими микротрубочками к шее почки и кончику почки. ПТВ удваиваются рано в клеточном цикле (б), и ядерные микротрубочки, соединяющие два полюса ПТВ, тянут ПТВ врозь (в–г), что приводит к растяжению ядра (д). В клеточном цикле (д) сестринские хроматиды (не показаны) каждая из которых прикреплена микротрубочками к ПТВ, расходятся к противоположным полюсам ядра. Ядро делится на два и сформированное цитокинетическое кольцо из актиновых микрофиламентов быстро сокращается вокруг шеи почки, далее секреция, направляемая актиновыми микрофиламентами (или кабелями), приводит к формированию септы между материнской и дочерней клеткой (е). Как только септа сформирована полностью, средний слой септы лизируется и две клетки разделяются (Schott et al., 2002).

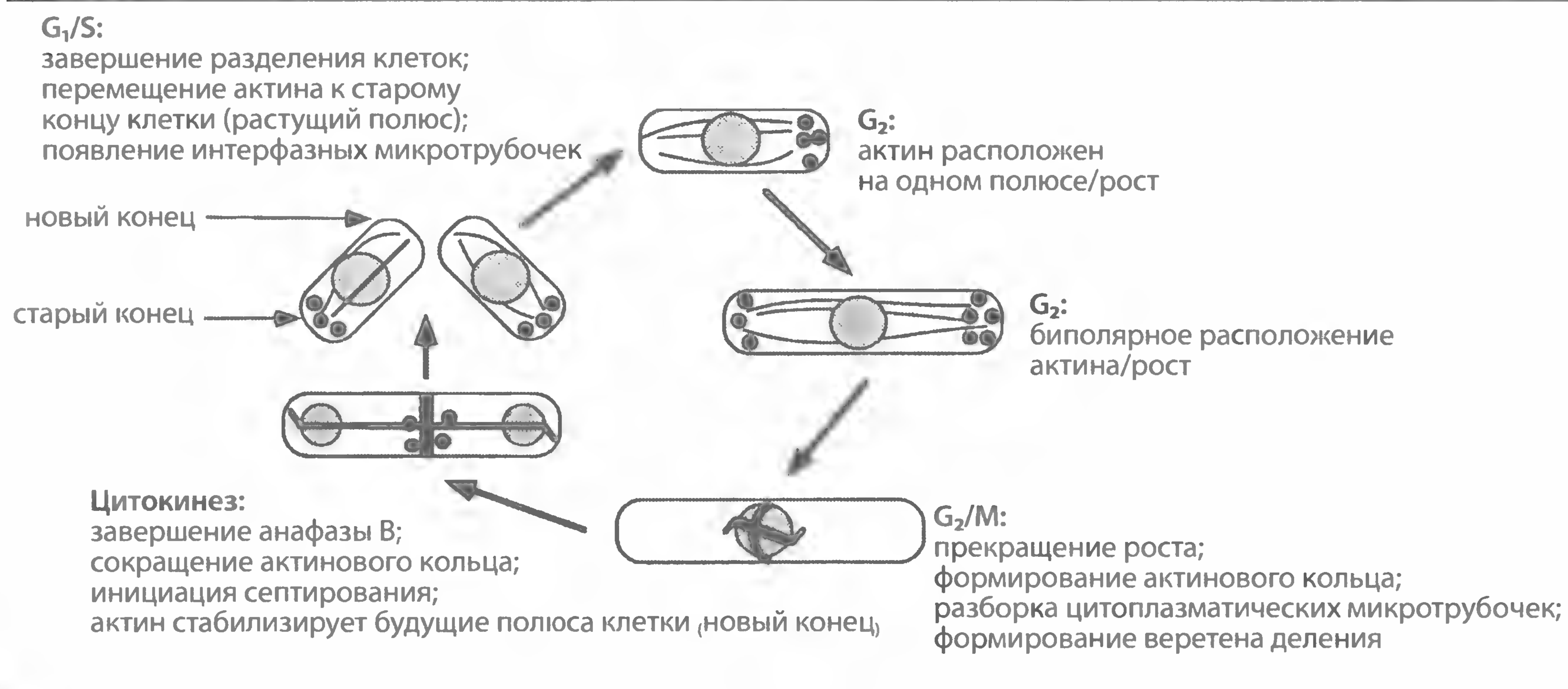


Рис. 45. Структурная реорганизация актина и тубулина в клеточном цикле у *Schizosaccharomyces pombe* Актиновые патчи (черные овалы) расположены на растущих полюсах интерфазных клеток, а сократительное кольцо актина участвует в формировании септы и цитокинезе Вновь разделившиеся клетки растут только на старом конце (это завершает клеточный цикл); далее происходит появление нового конца роста с биполярно расположенным актином. Цитоплазматические микротрубочки (черные линии) расположены между полюсами клетки в интерфазе В стадию G_2/M цитоплазматические микротрубочки реорганизуются во внутриядерное веретено деления (May, Hyams, 1998).

Исследования показали, что интактные МТ необходимы для быстрого роста и растяжения кончика гифы у *A. nidulans* и *U. maydis*. Исследоваия Ж.Р. Эйста выявили участие микротрубочек в миграции и положении ядер у апикально растущих грибов, за исключением зигомицетов. Для мицелиального гриба *Neurospora crassa* и делящихся дрожжей показано участие микротрубочек в транспорте митохондрий. Однако у почкующихся дрожжей и *A. nidulans* митохондрии транспортируются по актиновым путям.

Было прослежено поведение микротрубочек у почкующихся дрожжей на протяжении всего цикла развития клетки. На рис. 44 представлена общая схема поведения элементов цитоскелета *S. cerevisiae*. У интерфазных клеток *S. cerevisiae* короткие МТ прикрепляются к ядрам и обеспечивают их движение за счет роста и последовательного сокращения

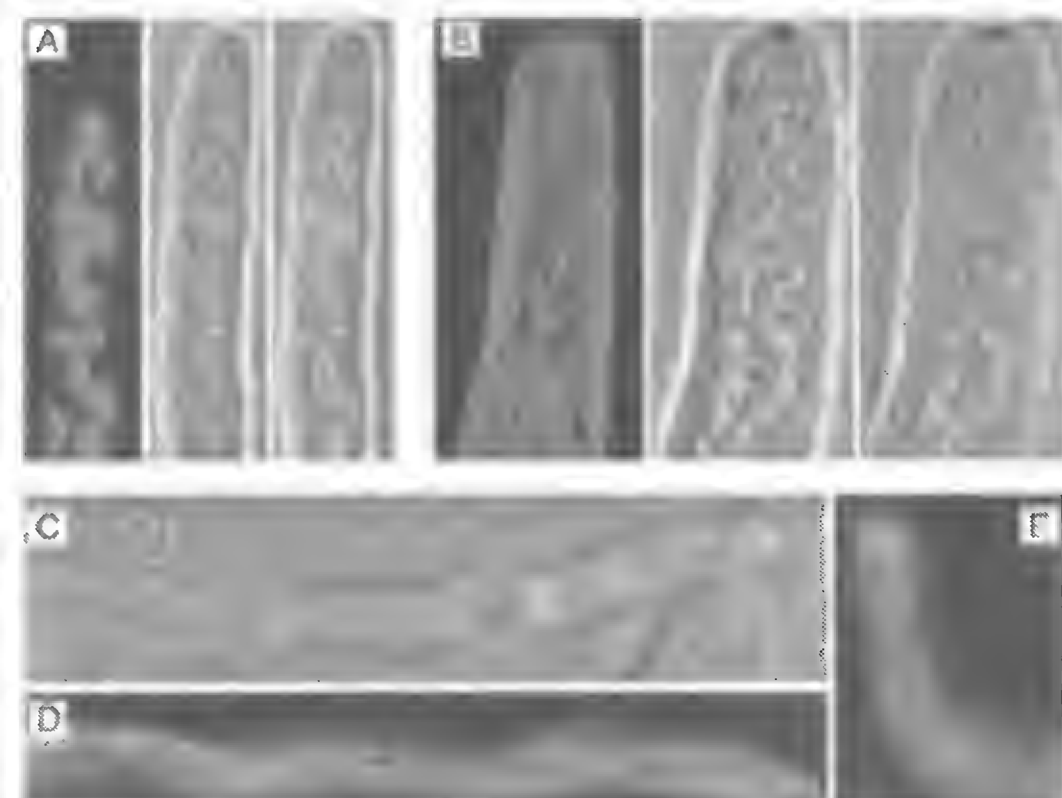


Рис. 46. Организация микротрубочек, актина и ядер.
A. Кончик гифы *Neurospora crassa* с ядрами, маркированными GFP: *слева* — флуоресценция ядер, *в центре* — фазовый контраст, *справа* — совмещение двух методов наблюдения
B. МТ, маркированные GFP в кончике гифы *N. crassa*.
C. Ядра, маркированные GFP в кончике гифы *Aspergillus nidulans*.
D. МТ, маркированные GFP в кончике гифы *A. nidulans*.
E. Актин, маркированный GFP в кончике гифы *A. nidulans* (Fischer, 2007).

микротрубочек (рис. 44а). Ситуация изменяется при вступлении клетки в цикл деления. Образуются микротрубочки веретена деления. Помимо МТ веретена деления формируются цитоплазматические МТ, которые являются посредником связи ядра с кортексом клетки (рис. 44в, г, д).

У интерфазных клеток *S. pombe* по сравнению с *S. cerevisiae* имеется несколько цитоплазматических МТ, которые служат транспортерами маркеров концов клетки и определяют направление роста у этих дрожжей (рис. 45).

Среди мицелиальных грибов GFP-связанные МТ изучали впервые у *A. nidulans*. Обнаружено, что эти МТ не способны к сокращению, а их ориентация в клетке зависит от формы клетки мицелия, в большинстве своем они расположены параллельно продольной оси клетки одиночно по 3–6 МТ на клетку (рис. 46). МТ *A. nidulans* вытягиваются со скоростью около 14 мкм/мин, достигают кортекса и после некоторой паузы либо совсем деполимеризуются в ЦОМТ со скоростью около 30 мкм/мин, либо снова начинают полимеризоваться.

У *N. crassa* МТ формируют сеть в отличие от одиночно расположенных МТ *A. nidulans* (рис. 46). Исследования распределения МТ в клетке *N. crassa* были проделаны с использование метода иммунофлюоресценции с участием связанного с флюоресцентной меткой тубулина. Они выявили, что GFP-маркированные МТ после иммуноокрашивания состоят из нескольких индивидуальных МТ. Ориентация МТ в одном пучке может быть противоположной, а для скольжения индивидуальных МТ в пучке и поддержания полярности МТ требуется кинезиновый и динеиновый моторные белки

Для некоторых мицелиальных грибов характерно также образование пучков микротрубочек, отдельные микротрубочки в пределах пучка подвержены индивидуальной динамике и поведению.

С микротрубочками ассоциируют два вида белков: структурные белки (MAP-microtubuls-associated proteins) и белки транслокаторы (моторные белки). Функция и динамика МТ определяется поляризацией (плюс/минус концы) и связанными с микротрубочками белками (MAPs), которые по очереди могут контролировать активность ассоциированных с МТ моторных белков. MAPs играют структурную роль, участвуют непосредственно в процессе сборки микротрубочек, регулируют критические стадии процессов сборки, а также осуществляют связь микротрубочек и других клеточных компонентов.

5.1.3. МТ-зависимые моторные белки

МТ и их динамика достаточны для осуществления транспорта грузов, направляемых к растущему концу клетки. Тем не менее, для гарантированного быстрого МТ-зависимого движения в клетке эукариот и грибов, в том числе, вовлечено два класса моторных белков: *динеин*, который движется по микротрубочкам от плюс-концов к минус-концам, и *кинезины*, транспортирующие грузы в обратном направлении (рис. 47). Некоторые кинезины также двигаются и в противоположном направлении. Оба класса моторных белков характеризуются моторным доменом, в котором происходит гидролиз АТФ.

Кинезины и динеины — белковые молекулы, имеющие некоторые общие черты в своем строении. По данным электронной микроскопии, наиболее изученные моторы представляют собой продолговатые молекулы длиной 40–100 нм. У них имеются две или три «головы» (моторные домены), которые примыкают к стержневой части молекулы (рис. 47). У кинезина и динеина противоположный конец стержня (хвостовой домен) также имеет глобулярную структуру. Однако по мере изучения большого числа моторных белков оказалось, что их морфология очень разнообразна. Внутри каждого класса белки обладают разной степенью гомологии по последовательности аминокислот моторного домена. Хвостовые области этих молекул сильно отличаются по размеру, структуре и аминокислотной последовательности, особенно это касается кинезинов. Считается, что именно хвостовой

домен определяет специфичность в отношении грузов (митохондрий, эндосом, лизосом, элементов цитоскелета и др.), переносимых данным белком. Показана ключевая роль динеина в миграции ядер, а также участие его в транспорте везикул.

Несмотря на то, что все грибы используют только один динеин для своих транспортных процессов, их геномы обычно содержат несколько генов, кодирующих кинезин. *A. nidulans* содержит 11, а *N. crassa* 10 разных кинезинов. Следует отметить, что у некоторых базидиомицетов тяжелая цепь, входящая в состав динеина, кодируется двумя генами.

Кроме согласованного действия цитоскелета и ассоциированных моторных белков, в переносе органелл также участвует ток цитоплазмы.

У клеток дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe* лучше всего изучены комплексы белков плюс конца микротрубочек (рис. 48). У *S. cerevisiae* взаимодействие МТ с периферией клетки (кортексом) играет важную роль в положении митотического веретена и миграции ядер. Динеин локализован на кончике МТ и сцеплен с растущей микротрубочкой, направлен-

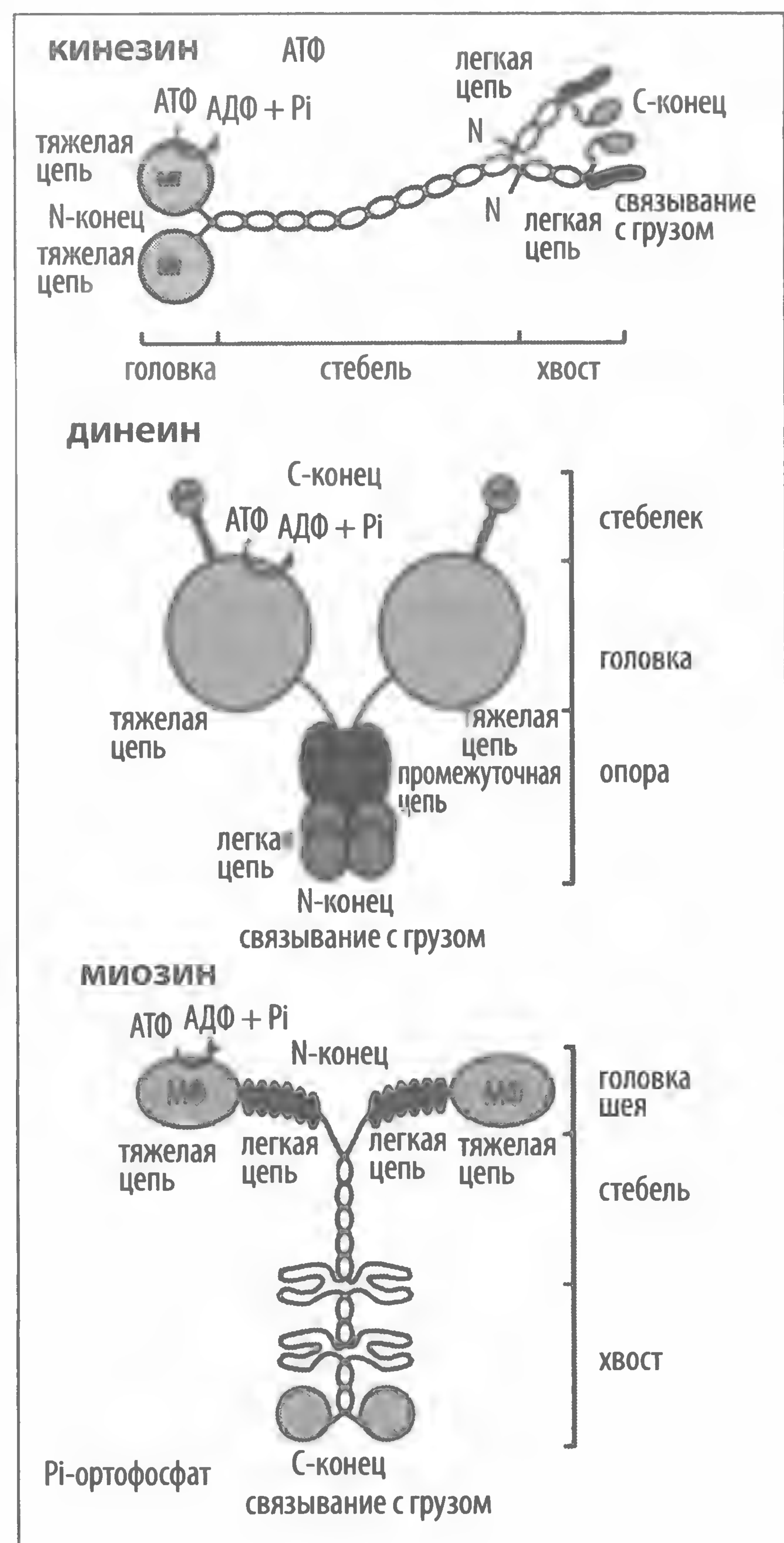


Рис. 47. Молекулярные моторы.
Известные моторные белки могут быть трех основных типов: связанные с МТ кинезины и динеины и связанные с актином миозины. В большинстве случаев моторные белки состоят из гомодимера тяжелых цепей и варьирующих по числу связанных с ними легких цепей. Тяжелая цепь сформирована из глобулярного моторного домена, который связан с микротрубочками (МТ) или F-актином (микрофиламентами, МФ). Расщепление АТФ приводит к конформационным изменениям в двух моторных доменах, которые вызывают скоординированное перемещение моторов вдоль нитей цитоскелета (Steinberg, 1998).

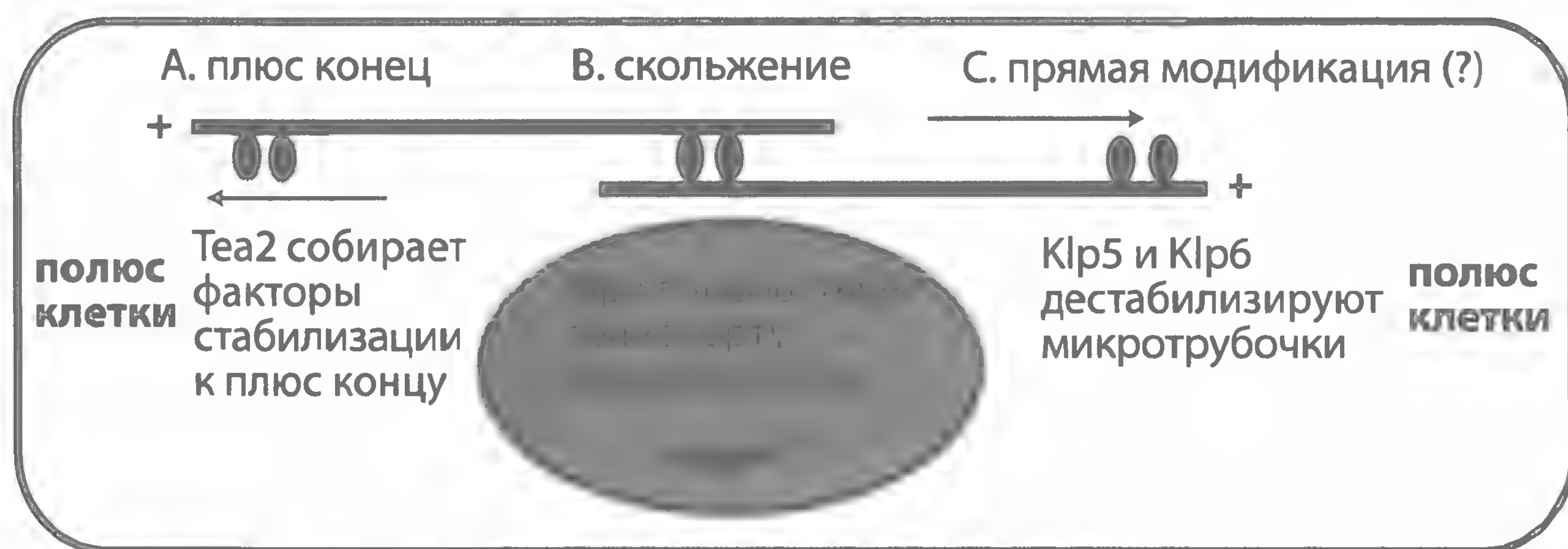


Рис. 48. Моторные белки микротрубочек у *Schizosaccharomyces pombe*. Кинезин-7 (Tea2) участвует в транспорте стабилизирующих факторов к плюс концу МТ. Прямое действие Klp5 и Klp6 (кинезин-8) на плюс конец МТ спекулятивно. Однако моторные кинезины-8 имеют сходные биологические функции и слабое, но заметное сходство последовательностей с моторным белком Kinl, который, как известно, дестабилизирует МТ, прямо модифицируя плюс конец (Steinberg, 2007).

ной к кортексу. При активировании динеин тянет прикрепленную МТ по направлению к кортексу клетки. Это приводит к перемещению ядра. Кинезиновый моторный белок Kip2 у *S. cerevisiae* или Tea2 у *S. pombe*, по-видимому, отвечают за локализацию на плюс конце МТ таких белков, как CLIP170-подобный белок Bik1 (*S. cerevisiae*) или CLIP170-подобный белок Tip1 (*S. pombe*) (рис. 48). У *A. nidulans* CLIP170-подобный белок ClipA накапливается на плюс конце МТ и его локализация также зависит от гомолога Tea2/Kip2 KipA.

МТ–кортикальные взаимоотношения определяют зависимые от динеина положения ядер перед митозом у *S. cerevisiae*. У *A. nidulans* динеин также требуется для распределения и миграции ядер в клетке. Было показано, что взаимодействия плюс концов МТ с кортексом вносят вклад в динамику митотического веретена.

Несмотря на то, что роль белкового комплекса плюс конца МТ совершенно очевидна при генерации силы для перемещения органелл, его роль для поляризованного роста менее понятна. Показано, что МТ соединены у апекса гифы Известно, что везикулы постоянно транспортируются по направлению к ЦСВ (подробности в главе «Апикальный рост»), при этом положение концов МТ определяет локализацию ЦСВ. У мутанта *kipA* (*tea2/kip2*) *A. nidulans* МТ не сходятся в одной точке и гифа растет искривленно, а не прямо, что может быть связано с отсутствием белков, нормально транспортируемых KipA на плюс конце, которые осуществляют кортикальный контакт.

5.2. Актиновый цитоскелет

В состав **актинового цитоскелета грибов** входит множество белков, формирующих структуры, функционально и морфологически существенно отличающиеся друг от друга: **кортикальные патчи, актиновые кабели, цитокинетическое (актомиозиновое) кольцо**. Каждая из структур выполняет различные функции. Основной компонент этих структур **F-актин.**

5.2.1. F-актин. Организация, нуклеация и функции

Микрофиламенты актина (F-актин) — это полимеры двудоменных глобулярных мономеров G актина с молекулярной массой 43 кДа. У эукариотических клеток актиновый цитоскелет лежит в основе многочисленных процессов, включающих поляризацию, подвижность клетки, движение цитоплазмы, цитокинез, организацию поверхности клетки и внеклеточного матрикса.

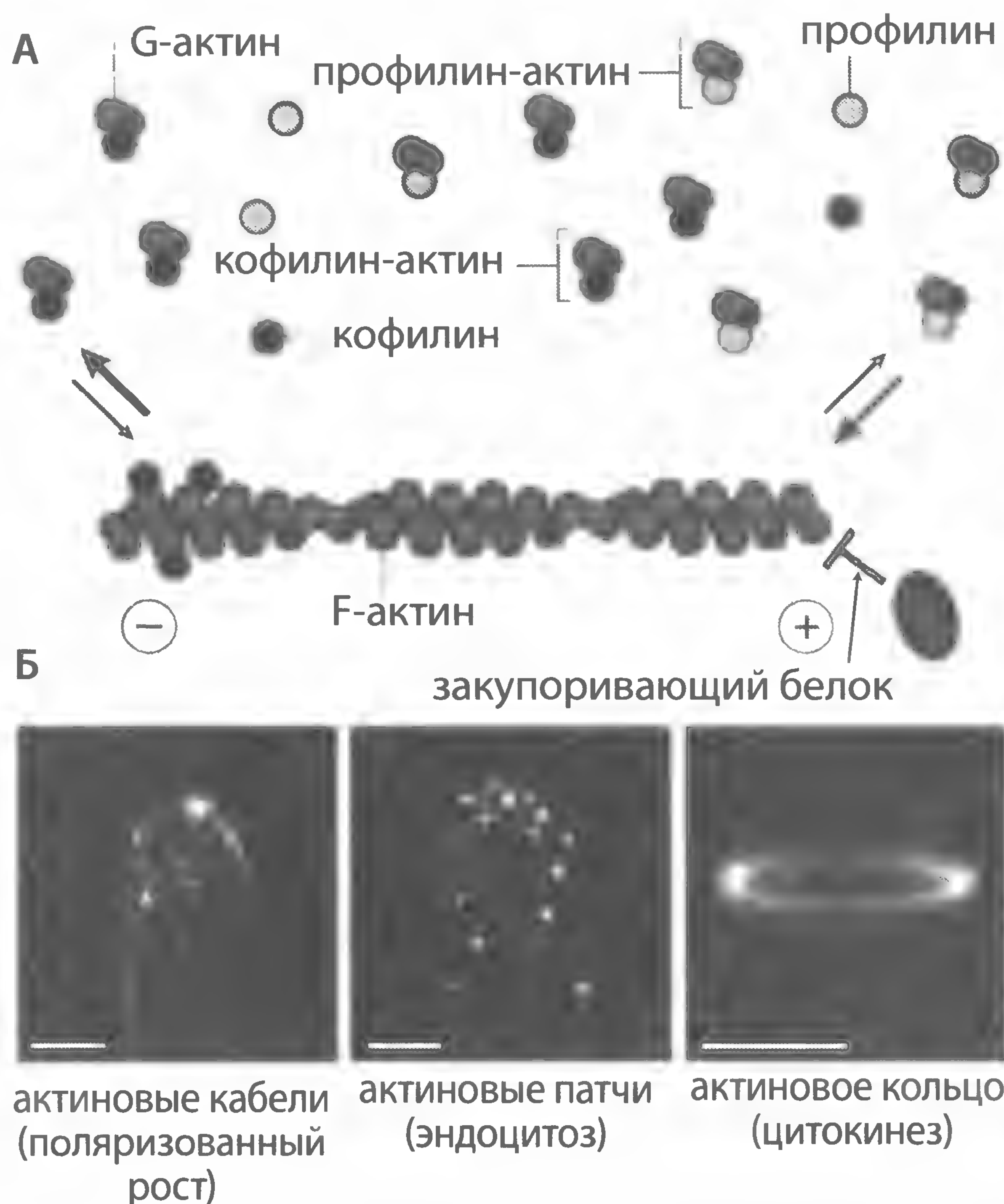


Рис. 49. Организация F-актина и его производные.
А. Фибриллярный актин (F-актин) – асимметричный полимер. У микрофиламента актина имеется плюс конец (также известный как «колючий» конец), связывающий субъединицы глобулярного актина (G-актин) быстрее, чем минус конец (также известный как «острый» конец). Два филамента формируют скрученный в спираль микрофиламент. Три важных связанных с актином белка регулируют динамику микрофиламента: кофилин (разбирает F-актин), профилин (захватывает G-актин) и закупоривающий белок (образует шапочку на плюс конце филамента, ингибируя его разборку). Б. F-Актин образует три высокоупорядоченные структуры, выполняющие разные функции. Актиновые кабели важны в поляризованном транспорте, актиновые глобулы участвуют в эндоцитозе и актиновые кольца сократительные структуры, которые участвуют в формировании септы в процессе цитокинеза. Масштабный отрезок 2 мкм (Berepiki et al., 2011).

Филаменты актина собираются из мономеров глобулярного актина (G-актина), переплетаясь в двойную спираль толщиной 5–10 нм (рис. 49А). Классически полимеризация F-актина была описана как ‘тредмиллинг’, то есть процесс, при котором происходит полимеризация на одном конце и деполимеризация на другом конце нити одновременно, но с разной скоростью, что и обеспечивает динамику перемещения. При этом на быстрорастущем (плюс) конце новые мономеры G-актина добавляются с более высокой скоростью, чем на минус конце. Нити актина ориентированы в направлении растяжения клетки. Три важных и связанных с актином белка (actin-binding proteins, ABPs) регулируют динамику микрофиламента: кофилин (англ. cofilin), который разбирает F-актин, профилин (англ. profilin), который захватывает G-актин, и закупоривающий белок (англ. capping protein), который

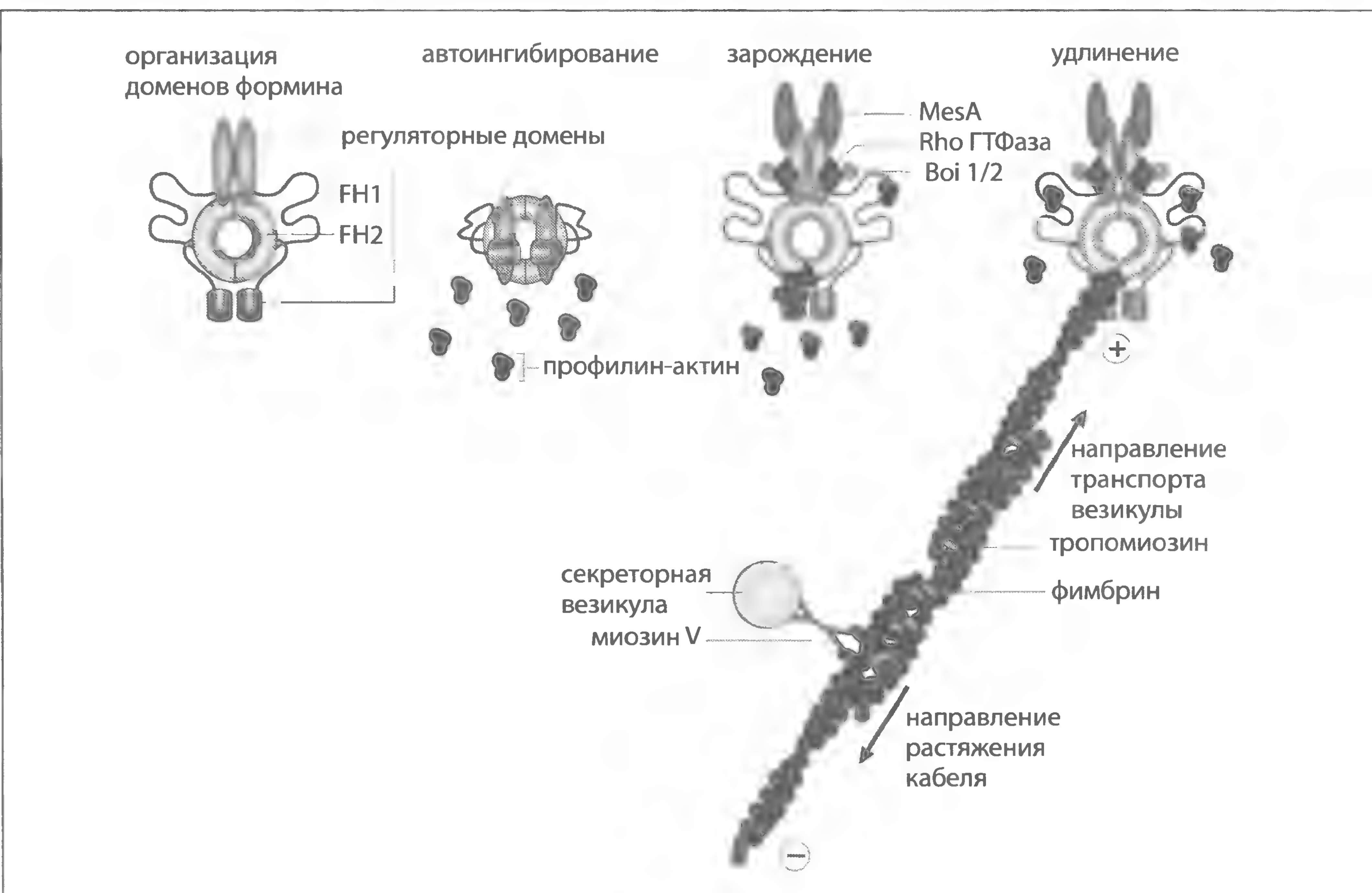


Рис. 50. Сборка актина. Роль формина, профилина и др. белков в сборке и сохранении филаментов актина и перемещении в гифе

Грибные формины регулируются автоингибиторными взаимоотношениями между каталитическим районом (состоящим из доменов FH1 и FH2) и регуляторными доменами на том же белке. Неактивное состояние поддерживается связыванием с активированными Rho ГТФазами, обеспечивая комплексам профилин-актин доступ к FH1 и FH2 доменам Дополнительные регуляторы, такие как MesA и Boi1/2, активируют формин и колокализованы у мицелиальных грибов. Комплексы профилин-актин связаны с доменом FH1 и доставляются на FH2 домен, что катализирует нуклеацию актина, формируя цепь полимера. Образованные микрофиламенты собираются в пучки при участии фимбрина и тропомиозина и служат транспортными путями для миозин V-зависимого транспорта секреторных везикул. Растяжение тяжей и транспорт везикул происходит в противоположных направлениях (Berepiki et al., 2011).

образует шапочку на плюс конце филамента, ингибируя его разборку. Динамика баланса между G-актином и F-актином определяет количество доступного F-актина в какой-либо конкретной области клетки.

Взаимодействие F-актина с разными опорными и актин-связанными белками (ABPs) организует сборку актина в три высокоупорядоченные структуры: F-актиновые патчи, кабели и актомиозиновое кольцо (рис. 49Б). Все три структуры имеют весьма консервативные функции у эукариот.

Зарождение (нуклеация) F-актина в глобулах и кабелях связано с белковым комплексом Arp2/3 и форминами соответственно. Формирование ветвящейся актиновой структуры происходит с участием комплекса Arp2/3, а неветвящейся структуры актина в кабелях — с участием форминов (рис. 50). При этом стабилизацию структуры филаментов актина обеспечивает *тропомиозин*. Тропомиозин представляет собой интегральный компонент цитоскелета клеток, стабилизирующий структуры актиновых кабелей и узлов. У *S. cerevisiae* идентифицированы два гена, кодирующих тропомиозин: *TPM1* и *TPM2*.

Главные регуляторы сборки и разборки F-актина — малые ГТФ-азы семейства Rho (клеточные сигнальные белки). Внеклеточный сигнал воспринимается мембранным рецепторным белком и затем передается на так называемые G-белки, — небольшие белки, способные связывать ГТФ, изменять свою конформацию и, благодаря этому, передавать сигналы на другую белковую молекулу. Гидролиз ГТФ до ГДФ G-белком возвращает его в неактивную конформацию. Некоторые G-белки (Rho, Rac и Cdc42) в итоге передают сигнал на белки WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), которые инициируют направленную полимеризацию актина за счет локальной активности комплекса Arp2/3.

Все члены семейства белков forminов содержат уникальные и консервативные домены (FH1 и FH2) и участвуют в формировании и сохранении филаментов F-актина. Богатый пролином FH1 домен соединяется с профилином (G-актин-связывающим белком). Взаимодействие формин-профилин приводит к высвобождению АТФ-связанных актиновых мономеров и наращиванию плюс конца актинового филамента. Домен FH2 не обнаруживает очевидного сходства последовательностей с каким-либо другим доменом или полипептидом и определяет уникальное свойство forminовых белков. Он контролирует нуклеацию актина *in vitro* и сборку актина *in vivo*.

Хотя forminов достаточно для зарождения актина *in vitro* и дополнительный фактор не требуется, связанные с формином белки оказываются важными для регуляции формин-зависимой сборки актина *in vivo*.

Актиновые кабели состоят из микрофиламентов актина, часто собранных в пучки, ориентированных вдоль оси клетки мать-дочка у почкующихся дрожжей или параллельно продольной оси гифы у мицелиальных грибов. Они служат для миозин-V-зависимого транспорта груза в дочернюю клетку или в полярно растущей гифе. Эти грузы у почкующихся дрожжей включают секреторные везикулы, мРНК и органеллы (ядра, митохондрии, эквивалент Гольджи и вакуоли). У мицелиальных грибов актиновые кабели принимают участие в основном в транспорте секреторных везикул.

F-актиновые патчи (англ. patches) представляют собой скопление коротких часто разветвленных филаментов актина. В среднем актиновый патч содержит 85 филаментов актина. Актиновые патчи располагаются в районах экзоцитоза в растущих клетках и необходимы для нормального роста и поляризации клеток. Актиновые глобулы также связаны с инвагинациями плазматической мембраны и формированием эндоцитозных везикул, содержат множество белков, участвующих в эндоцитозе. Эндоцитозные везикулы выщепляются из плазмалеммы и транспортируются к специфическим внутриклеточным пунктам назначения, где они освобождают свой груз (см. подробнее главу 6 «Эндомембранная система у грибов»).

Актином обогащен апикальный район у всех апикально растущих исследованных грибов, включая *A. nidulans*. F-актин, по-видимому, участвует в целевой доставке экзоцитозных везикул к местам апикальной секреции и регулирует слияние везикул с плазматической мембраной.

Актомиозиновое кольцо формируется в плоскости деления и играет ключевую роль в процессе деления клетки грибов (см. подробно в главе «Септирование и цитокинез»). Основными компонентами кольца являются F-Актин, миозин II и формины. Локализация актомиозинового кольца зависит от организации белков септинов в месте будущего деления (см. далее).

В гифе *Fusarium acuminatum* актин тесно связан с везикулами и органеллами. Микрофиламенты актина требуются у грибов для перемещения органелл, поляризованного роста и септирования (цитокинеза). Они необходимы также для секреции везикул и растяжения клеточной стенки.

5.2.2. Распределение актин-содержащих структур у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Дрожжевые клетки содержат три типа структур актина: актиновые кабели, актомиозиновое сократительное кольцо и кортикальные актиновые патчи, причем каждая из них подвергается интенсивной реорганизации в процессе клеточного цикла (рис. 44). Актомиозиновое сократительное кольцо собирается временно при протекании цитокинеза. Актиновые кабели ориентированы вдоль оси клетки мать-дочка и служат для миозин-V-зависимого перевоза груза в дочернюю клетку. Эти грузы включают в себя секреторные везикулы, мРНК, ядра, митохондрии, эквивалент Гольджи и вакуоли (рис. 51).

Формирование различных структур цитоскелета в клетках дрожжей контролируется внутри- и внеклеточными сигналами и координируется в соответствии со стадией клеточ-

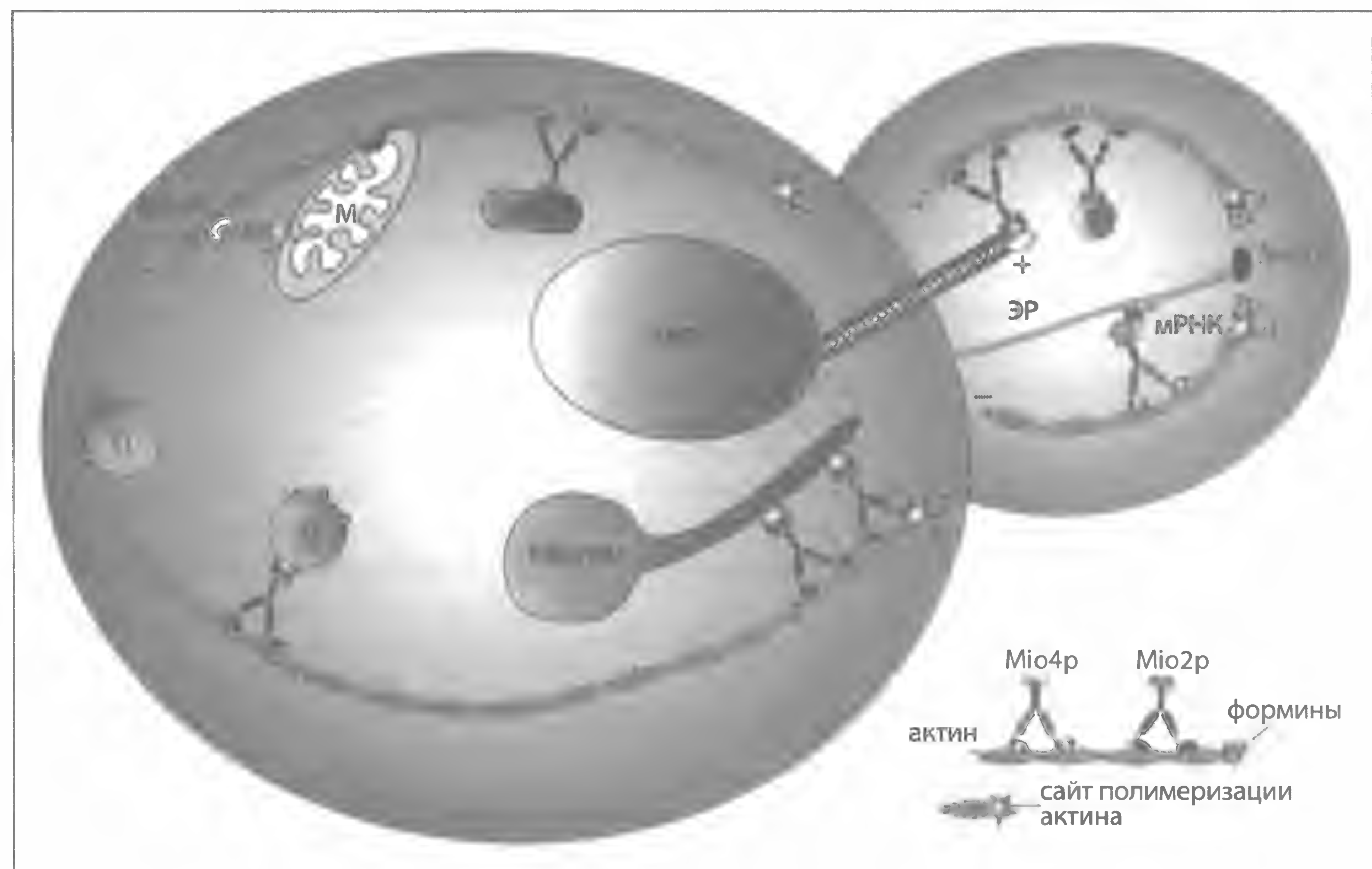


Рис. 51. Направленный в почку транспорт органелл у клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Формины заякорены на кончике почки и материнском рубце, где они осуществляют сборку поляризованных кабелей актина. Для простоты каждый актиновый кабель представлен как один актиновый филамент вместо пучка филаментов. Миозины V Myo2p и Myo4p, прикрепленные к актину — это (плюс)-конец-направленные молекулярные моторы, которые перевозят большинство внутриклеточных органелл. Myo2p переносит секреторные везикулы (в), эквивалент Гольджи (ЭГ), вакуоли и пероксисомы (П) к местам активного роста, а также принимает участие в исходной ориентации ядра путем транспорта плюс конца астральных микротрубочек в почку. Myo4p транспортирует предшественники кортикального эндоплазматического ретикулума (ЭР) к местам Sec3p-содержащего якоря. локализованного на кончике почки. Специфические молекулы мРНК мигрируют совместно с трубочками ЭР в почку. Митохондрия (М) ассоциирует с актиновыми кабелями и использует поступательное движение вперед, генерируемое Arp2/3-управляемой полимеризацией актина, для продвижения в почку. Для простоты показан только один Arp2/3-инициированный актиновый филамент. Звездами отмечены места внедрения новых мономеров актина в растущие филаменты актина в процессе полимеризации (Osumi et al., 2006).

ного цикла: на ранней стадии G_1 актиновые патчи равномерно распределены по всему кортексу неполяризованных клеток, а на стадии G_2 они локализуются у шейки и в самой почке. Важную роль в регуляции динамики цитоскелета могут играть процессы фосфорилирования–дефосфорилирования белков, входящих в его состав.

5.2.3. Миозины, актин-зависимые моторные белки

Функции актинового цитоскелета зависят от активности моторных белков миозинов. Миозины имеют общее с кинезинами и динсинами строение (рис. 47). Принадлежность к миозиновому суперсемейству определяется наличием тяжелой цепи с консервативным каталитическим доменом 80 кДа. У большинства миозинов за каталитическим доменом следует α-спиральный участок для связывания легких цепей. Кроме того, почти все миозины имеют С-концевой хвост и/или N-концевое продолжение цепи, которые, по-видимому, и обеспечивают такие класс-специфические свойства, как связывание мембран и протеинкиназная активность.

Миозины используются для разных клеточных функций и группируются в 18 разных классов. У *A. nidulans* были идентифицированы миозины из трех классов. Миозины класса I участвуют в секреции белка и поляризованном росте. Они локализованы у растущего кончика гифы и участвуют в транспорте везикул к кортексу клетки и слиянии везикул с клеточной мембраной. Микромицет *A. nidulans* использует миозиновый моторный домен класса V и VI для транспортировки хитинсинтаз, с которыми моторный домен непосредственно связывается.

Ключевая роль миозинов класса V была выявлена у *Candida albicans* и *Ustilago maydis*. У *C. albicans* миозин CaMyo2p необходим для корректной поляризации актинового цитоскелета, без него у клеток не происходит индукции зародышевой трубки и гифального роста. Подобно этому, белок Myo-5 необходим для нормального разделения клеток, спаривания, роста гифы и патогенности. Эффективная MyoV-зависимая секреция компонентов клеточной стенки важна при трансформации дрожжи → мицелий у диморфного патогенного гриба *C. albicans*. Миозиновые моторные белки класса V описаны у *S. cerevisiae*, они участвуют в транспорте РНК, наследовании пероксисом и других органелл. Делеция миозинового гена *myoA* у грибов летальна.

5.3. Промежуточные филаменты грибов — септины

5.3.1. Общие сведения о структуре и функциях септинов

Септины встречаются у клеток грибов и животных и представляют собой пучки неполярных филаментов, промежуточные по толщине между микротрубочками и филаментами F-актина, в диапазоне 8–12 нм в диаметре. До сравнительно недавнего времени практически не было ничего известно о промежуточных филаментах цитоскелета у грибов за исключением единичных сообщений: обнаруженного кольца филаментов в перешейке у *S. cerevisiae* и цитоплазматических филаментов у *N. crassa*. Исходно септины были идентифицированы при исследовании мутантов *S. cerevisiae* с дефектами зарождения почки и цитокинеза Л.Х. Хартвеллом в 1971 г. Начиная с обнаружения промежуточных по размеру филаментов цитоскелета у *S. cerevisiae*, сейчас называемых *септинами* (из семейства ГТФ-связывающих белков), гомологи септинов обнаружены у многих грибов.

Все септины имеют структурное сходство. Они состоят из нескольких субъединиц: различные септиновые мономеры собраны в олигомеры, которые в свою очередь собраны в высокоупорядоченные структуры. Эти структуры состоят из разного количества субъединиц в зависимости от организма.

Структура септинов и организация их доменов высоко консервативны у всех исследуемых организмов. Полипептид обычно имеет два глобулярных домена на N- и С-концах, которые соединены протяженным суперскрученным палочковидным доменом, состоящим из альфа-спиралей. Основной строительный блок филамента — димер, а не мономер. Большинство из них содержат Р-петлю ГТФ-связывающего домена со стороны N-конца. Большая часть септинов также имеет С-концевое расширение в виде свернутой спирали, которое является связующим звеном между септинами в клетке. Последний эволюционный анализ септинов в разных царствах организмов показал, что они могут быть разделены на пять разных групп и члены группы 1А (к которой принадлежит Cdc10 *S. cerevisiae*) не имеют свернутой спирали на С- конце.

Общие функции септинов у разных организмов, исследованных к настоящему времени, также консервативны. Они служат опорой для других белков и действуют как диффузный барьер для белков цитоплазмы, локализованных около цитоплазматической мембраны.

5.3.2. Септины Saccharomyces cerevisiae. Структура и функции

Более 30 лет назад электронно-микроскопические исследования, проведенные на почкующихся дрожжах, выявили наличие так называемых «10-нм филаментов», окружающих почку (рис. 52). Позднее выяснили, что септины имеют зависимую от клеточного цикла локализацию в непочкующихся клетках.

Септины создают пространственные метки на кортексе клетки, которые сохраняются на протяжении всего клеточного цикла. Эти ориентиры позволяют направлять маркеры полярности и белки почкования к зарождающемуся месту почкования.

В клеточном цикле септины определяют плоскость деления ядра и имеют значение при миграции ядер в дочернюю клетку после митоза. Они являются местом связи между веретеном деления и перешейком почки. Септины играют ключевую роль в контрольных точках морфогенеза, которые отвечают за координацию между корректной морфологией перешейка и протеканием клеточного цикла с участием регуляторов Hsl1, Hsl7 и киназы Swe1.

Также известно, что септиновое кольцо у почкующихся дрожжей обеспечивает асимметричную локализацию белков с обеих сторон плоскости деления. Например, белок Bni4 локализован в перешейке с материнской стороны, а киназа Kcc4, наоборот, локализована со стороны почки, что в свою очередь приводит к разным функциям этих белков. Как достигается эта асимметрия, пока неизвестно, но мутации, которые затрагивают структуру септинов перед появлением почки, нарушают эту асимметричную локализацию. Это давало возможность предположить, что структура самого септина асимметрична или имеет полярность филаментов.

Однако, как было показано, септиновые филаменты неполярны и по данным электронной микроскопии организация субъединиц септина в кольцо симметрична. Организация асимметрии септинов достигается благодаря модификации SUMOилированием или посттрансляционной модификацией белков. Модифицированные SUMOилированием септины Cdc3, Cdc11 и Shs1 приобретают асимметрию, влияя только на материнскую сторону септинового кольца.

Связь между материнской и дочерней клеткой может происходить в перешейке. Поддерживать асимметрию между материнской и дочерней клетками очень важно, чтобы обеспечить направление сигнальных путей и, таким образом, избежать неправильной сигнализации. Один из механизмов, выработанный клеткой, это создание диффузионного барьера в перешейке, который блокирует свободное движение белков от одной клетки к другой. Корректное функционирование этой структуры обеспечивает асимметричное распределение белков, ограничивая их перемещение между двумя клетками и создавая полярность клетки. В начале цитокинеза происходит деление септинового кольца. Это создает двойной диффузионный барьер между материнской и дочерней клетками и об-

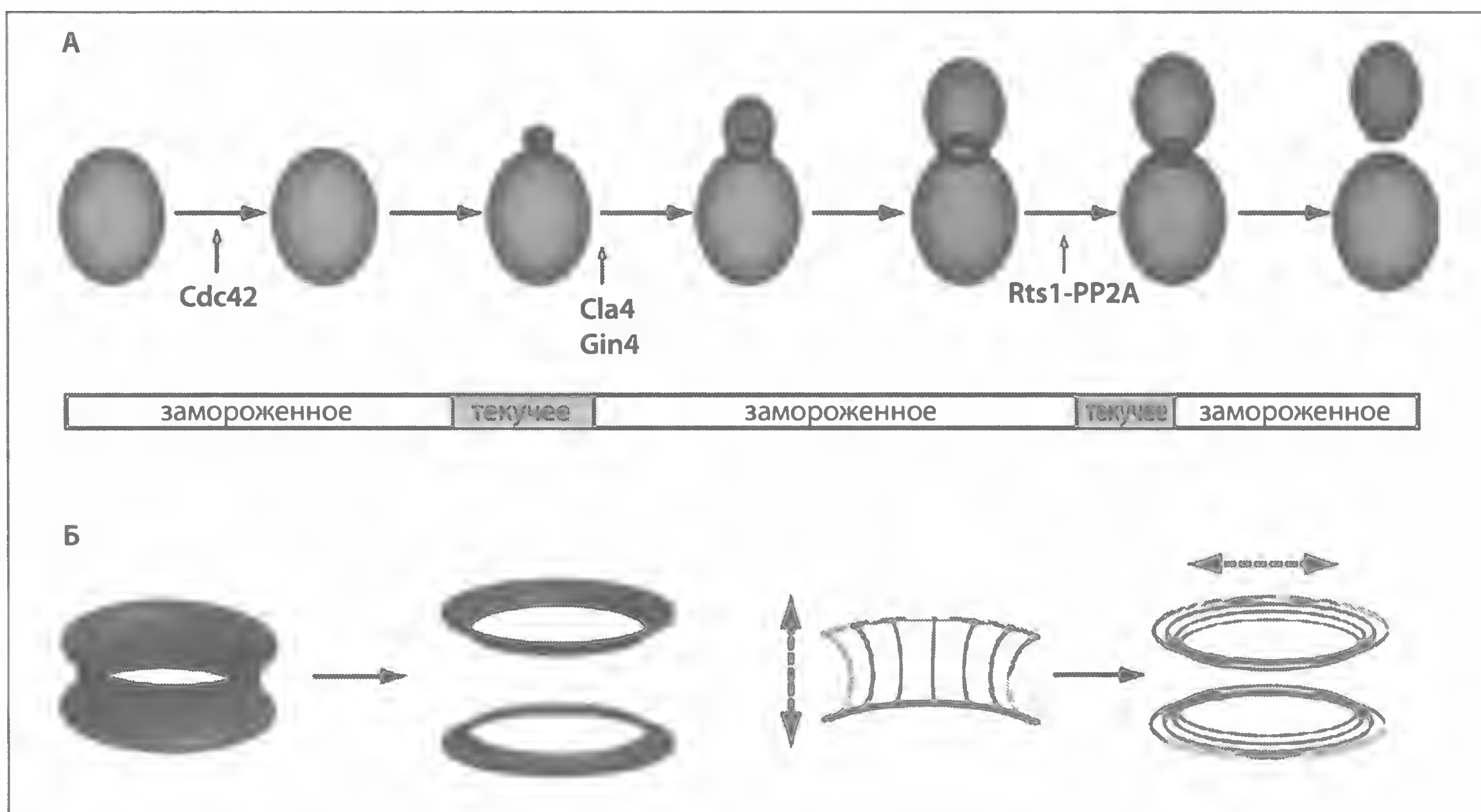


Рис. 52. Динамика септинов у *Saccharomyces cerevisiae*
А. Динамика септиновых субъединиц внутри кольца зависит от клеточного цикла Только во время появления почки и цитокинеза состояние септинов «текучее», в остальные периоды — «замороженное». Показаны белки, важные для сборки и динамики септинов. Нижняя линия представляет периоды поведения септинов «замороженное» (белым) или «текучее» (серым) в клеточном цикле.
Б. Динамика септинового кольца. Деление септинового воротничка на два кольца (левая часть) сопровождается поворотом на 90° септиновых филаментов расположение которых меняется от параллельного по отношению к оси мать-дочь к параллельному по отношению к септе (правая часть) (González-Novo et al., 2009).

разует специализированный компартмент для цитокинеза. Это замкнутое пространство гарантирует, прежде всего, что машина биогенеза септы и позднее гидролитические ферменты, необходимые для контролируемого растворения септы, будут ограничены районом перешейка.

Недавно была продемонстрирована удивительная роль диффузионного барьера, которая определяется септинами и связанным с ними белком Bud6. Удалось показать, что септины регулируют диффузию белков, связанных с плазмалеммой, и мембранных белков эндоплазматического ретикулума (ЭР), образуя отдельные компартменты. В отличие от мембранных белков ЭР, белки, находящиеся в полости ЭР, способны свободно перемещаться между материнской и дочерней клетками. Диффузионный барьер также влияет на ядерную мембрану во время анафазы и, как следствие этого, дочерняя клетка наследует только вновь синтезируемые ядерные поры. Биологические последствия этого наблюдения впечатляют, так как старые комплексы ядерных пор имеют сопутствующие нецентромерные *эписомы* (генетические элементы, которые могут существовать в клетке независимо от хромосомы), вносящие вклад в старение. Таким образом, септиновое кольцо играет роль не только в поддержании асимметрии, но и имеет особую функцию в ограничении процесса старения.

В месте будущего почкования клетки дрожжей септины создают шапочку, позднее образующую кольцо, через которое появляется почка. Так как почка растет, септиновое

кольцо становится воротничком, оно расширяется вокруг почки и во время цитокинеза делится на два септиновых кольца: одно локализовано в материнской клетке, а другое в дочерней клетке. В конце концов, септиновое кольцо разбирается, а новая септиновая шапочка маркирует место будущего почкования в следующем цикле деления (рис. 52). Все эти переходы тщательно регулируются и координируются с прогрессией клеточного цикла через действие нескольких сигнальных путей. Так, формирование шапочки требует Cdc42 ГТФазы, которая выполняет определенную роль в формировании септинового кольца, независимо от ее роли в полимеризации актина. Белки, такие как Bni5 и Elm1, а также фосфорилирование септинов Cla4 киназами PAK и Gin4 необходимы для формирования воротничка (рис. 52). Это фосфорилирование сохраняется собственно до начала цитокинеза, когда происходит дефосфорилирование септинов фосфатазой PP2A.

Септиновое кольцо разбирается после цитокинеза, что требует SUMOилирования септинов Cdc3, Cdc11 и Shs1, а также фосфорилирование Cdc3 при участии Cdc28. Дополнительно к классическим определенным местам локализации септинов совсем недавно было показано, что в ответ на голодание септины в клетках разбираются у перешейка и перемещаются к веретену, ассоциируя с ним как в митотических, так и в мейотических клетках. Точная природа такой локализации еще неясна, но это может быть механизмом запасания септинов до восстановления оптимальных питательных условий, позволяющим клеткам быстро реутилизировать септины, чтобы начать расти.

Было продемонстрировано, что септиновые субъединицы стабильны и после разборки септинового кольца они используются в последующих клеточных циклах в смеси со вновь синтезируемыми субъединицами. Эта стабильность также поддерживается в процессе мейоза, то есть не зависит от морфогенетической программы.

Хорошо известна способность септинов полимеризоваться *in vitro* в филаменты, которые можно видеть с помощью электронного микроскопа. Однако точная структура филаментов и порядок расположения мономеров остается загадкой, которую мы только сейчас начинаем понимать. У почкующихся дрожжей основная единица полимеризации гетеро-тетрамер, содержащий копии септинов Cdc3, Cdc10, Cdc11 и Cdc12. Гетероолигомеры септинов дрожжей состоят из восьми субъединиц и порядок сборки в неполярном гетеро-октамере следующий: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. Октамеры могут далее связываться через Cdc11 при сборке в неполярные филаменты (рис. 53). Исследования показали, что в основном структура септинового комплекса общая для всех эукариотических организмов.

У *S. cerevisiae* во время вегетативного роста присутствует пять септинов: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 и Shs1. Во время спороношения два из них Cdc12 и Shs1 заменяются на два других, специфичных для спороношения септина Spr3 и Spr28, хотя изначально было показано их участие в цитокинезе.

Эксперименты по восстановлению флуоресценции после фотооблучения (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) показали, что субъединицы септина могут свободно передвигаться внутри кольца во время появления почки и цитокинеза, находясь в «текучем» состоянии, в то время как на остальных стадиях клеточного цикла они не могут перемещаться, находясь в «замороженном» состоянии. При этом не выявлено перемещения септиновых субъединиц в цитоплазму (рис. 53А). Фосфорилирование/дефосфорилирование субъединицы септина Shs1 отвечает за «текучесть» септинов в процессе цитокинеза. Было показано, что в воротничке *S. cerevisiae* септиновые филаменты ориентированы параллельно оси мать-дочь, а в процессе цитокинеза они поворачиваются на 90° и становятся параллельны септе (рис. 52Б).

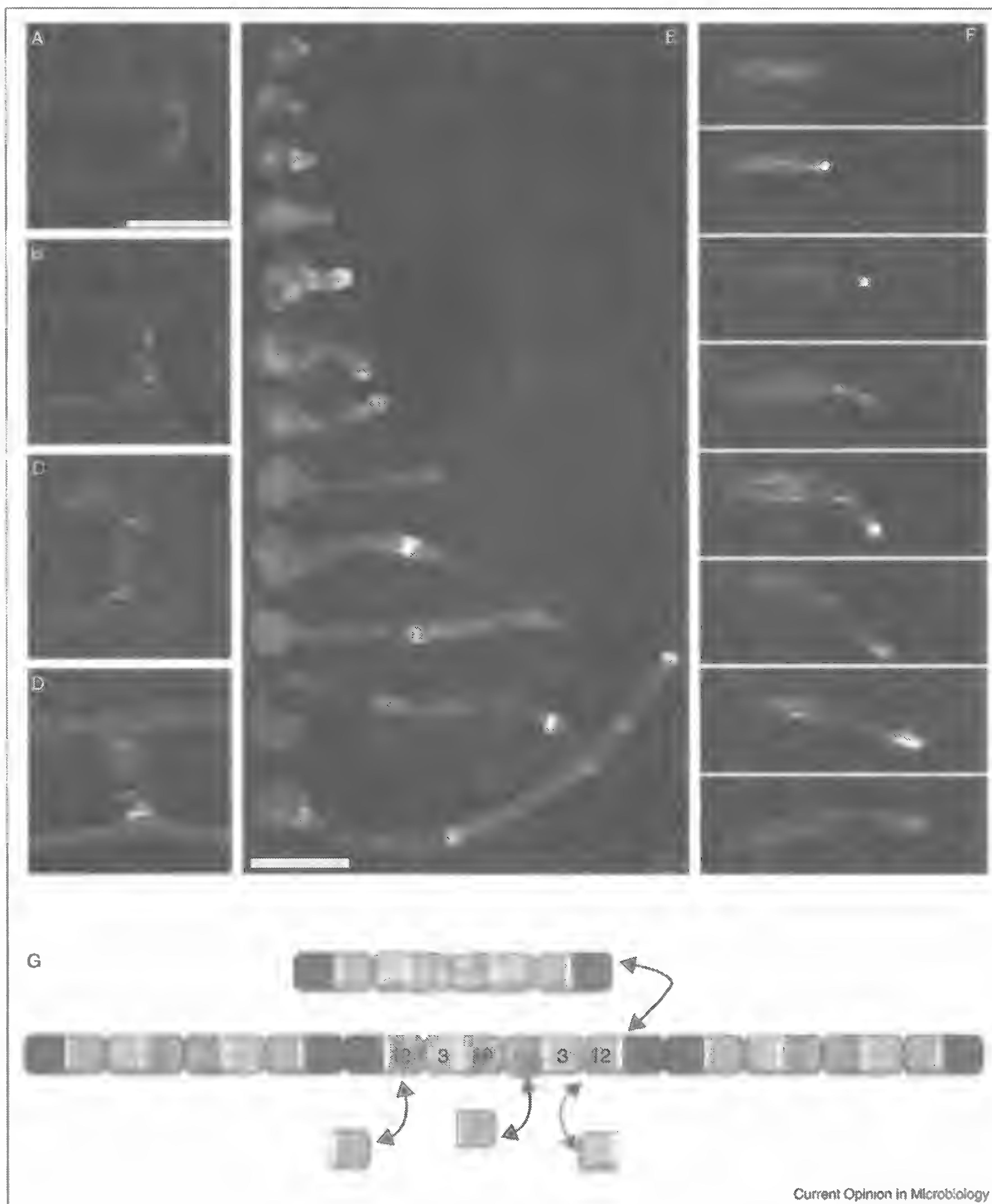


Рис. 53. Сборка септиновых колец у грибов.

a–d. Динамика септинов у *Ashbya gossypii*: стадия формирования диффузных «скоплений» септинов у апекса гифы (a), удаление септинов от кончика (b), расположение в виде дискретных пятен (c) и зрелое кольцо (d). Масштабный отрезок 5 мкм.

e. Образование ростковой трубки и гифы у *Candida albicans*. Сборка септина у гифы *Candida albicans* начинается с появлением ростковой трубки (стрелки) и формирование нескольких последовательных колец у септированной гифы (стрелки). Масштабный отрезок 10 мкм.

f. Локализация Sep4, маркированного GFP, в клеточном цикле *Ustilago maydis*.

g. Схема полимеризации септинового комплекса, в котором один протофиламент (он состоит из восьми септиновых белков) имеет индивидуальные субъединицы с цифровой маркировкой, базирующейся на номенклатуре *S. cerevisiae*, и соответствующих по номерам септинам Cdc10, Cdc3, Cdc12 и Cdc11. Показаны два возможных и не исключающих друг друга сценария обмена внутри полимера, при котором протофиламенты или индивидуальные субъединицы являются единицей обмена (Gladfelter, 2010).

5.3.3. Септины Candida albicans. Локализация и функции

Вслед за находками у *S. cerevisiae* 10-нм филаменты были обнаружены в перешейке дрожжевых клеток полиморфного патогенного для человека гриба *C. albicans*.

Сиквенс генома этого гриба выявил присутствие семи генов, кодирующих септины. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности показали высокую степень консервативности при сравнении с почкующимися дрожжами. Поколение нулевых мутантов по генам, кодирующим семь септинов, показало, что два из них (*CDC3* и *CDC12*) важны для жизнеспособности клетки, а ортологи, специфичные для споруляции, не выявили экспрессии в исследуемых условиях. Мутанты по генам *CDC10* и *CDC11* имели морфологические дефекты, такие как аномальная форма почки или нарушенное отложение хитина.

Исследования септинов у дрожжевых клеток *C. albicans* выявили сходство с почкующимися дрожжами *S. cerevisiae* в отношении их локализации (рис. 54). Характерная морфогенетическая черта гриба *C. albicans* — способность переключать свой рост с дрожжевого на мицелиальный в ответ на внешние стимулы (температура, pH, добавление сыворотки и др.). Этот феномен является критичным для патогенеза. В организме человека в патологическом материале (кожа, внутренние органы) при системном микозе выявляют псевдомицелий и мицелий, а в смыве со слизистых — дрожжевые клетки. В лабораторных условиях дрожжевой рост наблюдается при температуре ниже 30 С, pH 4; псевдогифы — 34 С, pH 6; гифы — 37 С и pH 7. Гифальный рост характеризуется специфическими чертами, которые отличают его от дрожжевого роста. Во-первых, гифа растет постоянно поляризованным образом. Это нашло отражение в поляризации актина: кластер актиновых кортикальных патчей постоянен на растущем кончике и кабели актина ориентированы в направлении кончика. Во-вторых в процессе роста гифы не происходит разделения клеток, что приводит к формированию септированного мицелия. Наконец, другая особенность гифального роста относится к септиновым кольцам, так как они не разбираются немедленно после цитокинеза, а остаются по обе стороны от перегородки. По этой причине в длинной гифе у септы апикальной клетки наблюдается более, чем одно септиновое кольцо.

При индукции дрожжевых клеток к формированию мицелия *C. albicans* могут быть обнаружены три типа септиновых структур (рис. 54). При появлении ростковой трубки септины собираются в диффузную структуру, известную как базальная лента, состоящая из параллельных полосок. Позднее первое септальное кольцо гифы собирается не в месте соединения клетки и ростковой трубки, а на расстоянии 10- 15 нм вглубь ростковой трубки. Септины могут также быть обнаружены в виде шапочки на кончике растущей гифы.

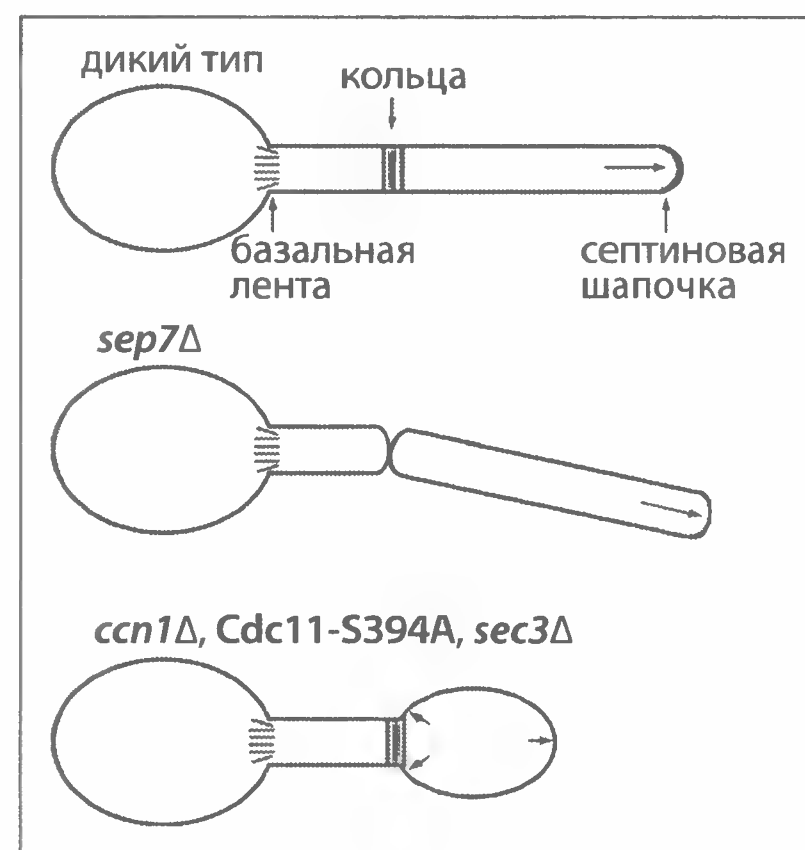


Рис. 54. Схематичное изображение морфологии гифы и распределение септинов у дикого штамма и мутантов *sep7*Δ, *ccn1*Δ, *sec3*Δ и *CDC11*-S394A *Candida albicans*

Гифа штамма дикого типа показывает образец апикального роста, секреция направлена к кончику гифы. Мутант нормальной сборки филаментов *sep7*Δ: его септиновые кольца разбираются после цитокинеза и гифальные компартменты разделяются. Мутанты *ccn1*Δ, *sec3*Δ и *CDC11*-S394A имеют нормальное развитие гифы вплоть до сборки первой септы, после которой формируется вздутый дистальный компартмент. Обозначения: септины показаны серым цветом, септа черным, стрелка показывает направление поляризованной секреции (González-Novo et al., 2009).

Эта гифо-специфичная локализация септинов служит как детерминанта роста настоящей гифы в отличие от псевдо-гифального роста.

Локализация и динамика септинов у клеток дрожжей *C albicans* неотличимы от описанных для *S. cerevisiae*, и септиновые кольца, формирующиеся у горлышка почки, имеют регулируемые клеточным циклом «замороженное» и «текучее» состояния. Однако индукция гифы приводит к важным различиям в аспектах биологии септинов. В зависимости от типа роста (дрожжевой/мицелиальный) изменяется локализация септинов в клетке. Меняются и динамичные свойства септинов. Изучение динамики септинов показало, что в клетках гифы септиновые кольца переходят в «гифа-специфичное» состояние, которое отличается от «замороженного» и «текучего» состояния в клетках дрожжей. Оно характеризуется динамичным состоянием септина Cdc10, который постоянно обменивается между септиновым кольцом и цитоплазматическим пулом, что имеет решающее значение в регуляции роста гифы

Септины экспрессируются конститутивно и необходимы для правильного развития настоящей гифы. Конверсия септинового кольца дрожжей в состояние, характерное для гифы — это пример дифференциальной регуляции компонентов, присутствующих и у дрожжей, и клеток гифы, и зависящей от наличия септинов Shs1/Sep7 и их фосфорилирования гифа-специфичным циклин-CDK комплексом Hgc1-Cdc28 (рис. 55). Ключевое значение имеет ингибирование в разделении гифы на компартменты, то есть формирование настоящей гифы. Септин Sep7 способствует ингибированию разъединения клеток в процессе гифального роста. У *C. albicans* активация программы разделения клеток требует фосфатазы Cdc14. Фосфатаза локализована около септы дрожжевых клеток в процессе цитокинеза, но не у септы гиф. Причина исключения фосфатазы Cdc14 из района септы гифы может быть в изменении опорных свойств "гифа-специфичного" септинового кольца, опосредованного Sep7.

Sep7 не имеет значения для сборки септинового комплекса или сборки септиновых филаментов. Однако Sep7 может собирать разные сигналы в процессе программы развития гифы, что необходимо для модификации свойств септинового кольца. Действительно, Sep7 является крупнейшим септином и содержит две области с высоким содержанием Ser/Thr

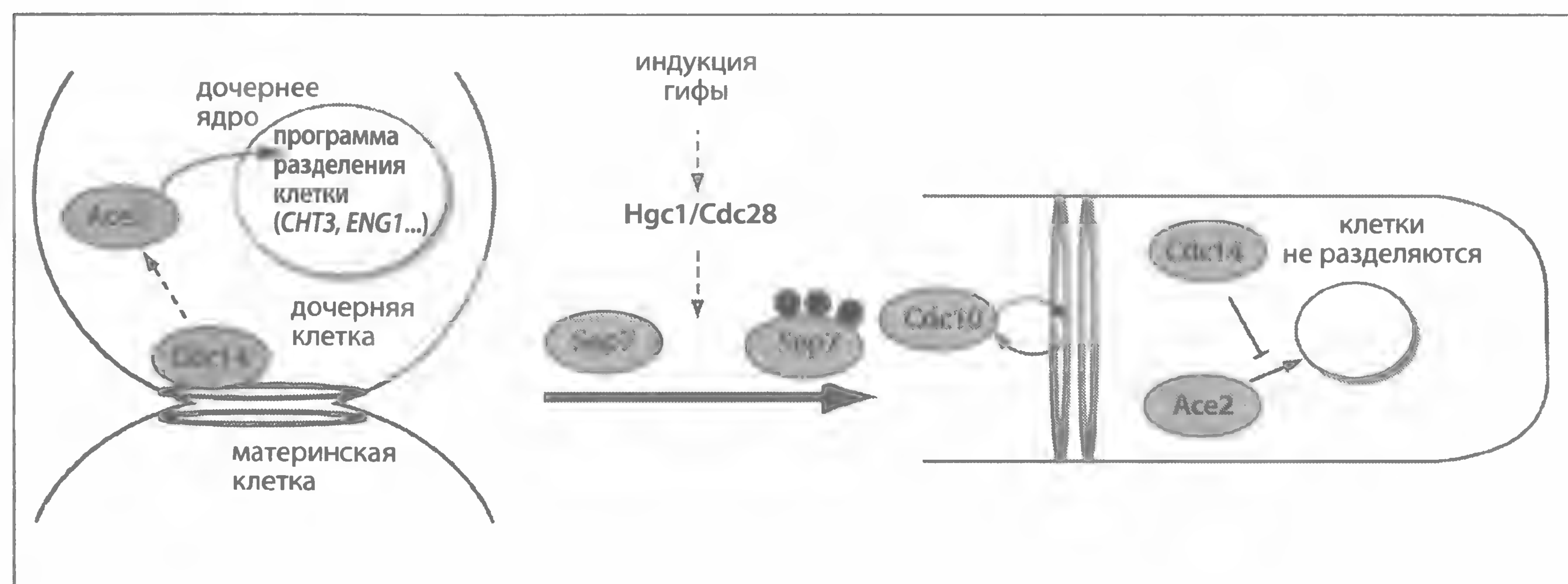


Рис. 55. Роль септинов в морфогенезе клеток почкующихся дрожжей. Септиновое кольцо дрожжей служит опорой для белка Cdc14, который необходим для локализации транскрипционного фактора Ace2 около дочернего ядра. Вследствие этого активируется программа разделения клеток и септа деградирует. При индукции гифального роста динамика септинового кольца изменяется на «гифа-специфичное» состояние, при котором Cdc10 быстро поступает из цитоплазматического пула (процесс зависит от септина Sep7 и его фосфорилирования, опосредованного Hgc1). Это изменяет опорное свойство септинового кольца, предотвращая локализацию Cdc14 около горлышка почки, что в конечном итоге блокирует разделение клеток Пунктирные линии показывают направление регуляции (González-Novo et al., 2009).

(одна между септиновым элементом и скрученным в спираль доменом и другая на С-конце после спирали), что может быть мишенью для множественного фосфорилирования разными киназами. Sep7 также фосфорилируется зависимым от Hgc1/Cdk1 путем в процессе роста гифы. На ранних этапах индукции гифы происходит фосфорилирование другого белка Cdc11. Двойное фосфорилирование (Sep7 и Cdc11) важно для индукции и сохранения роста гифы (рис. 56).

У многих организмов поляризованный рост зависит от поляризованной секреции везикул к растущему району клетки, обеспечивая материалом новую клеточную стенку и мембрану. Этот процесс у дрожжей зависит от мульти-белкового комплекса, называемого экзоциста. Исследования на *S. cerevisiae* показали, что при появлении почки септины направляют клеточный рост в основание почки, образуя типичное вздутие на дочерней стороне перешейка. У гифы *C. albicans* боковые стенки параллельны и нет никакого вздутия или сужения после септы, показывая, что рост гифы требует поляризованной секреции к септиновому кольцу гифы и к кончику филамента (рис. 54). Мутант *C. albicans sec3*Δ, который кодирует субъединицу экзоцисты, имеет фенотип, сходный с мутантом *ccn1*Δ или Cdc11-S394A (то есть утолщение кончика после сборки септинового кольца, рис. 54), показывая, что экзоциста и септиновый комплекс взаимодействуют в этом процессе.

Все приведенные выше результаты подтверждают, что при индукции гифы ключевую роль играют септины в создании и поддержании морфогенетических черт, которые специфичны для этого типа роста. Они выступают в качестве положительных сигналов для поляризованной секреции и роста кончика ростковой трубки и действуют как место ингибирования разделения клеток.

Хотя септины высоко консервативны у *S. cerevisiae* и *C. albicans*, модификации септинов различны у этих двух грибов. Важный сериновый остаток, который фосфорилируется у Cdc11 *C. albicans*, не сохраняется у ортолога *S. cerevisiae*. Напротив, ScCdc3 *S. cerevisiae* содержит два фосфорилированных остатка на своем С-конце, имеющие значение для стабильности септинового кольца и не сохраняющиеся у ортолога *C. albicans*. Это позволяет предположить, что указанные организмы разработали разные и специфичные системы регуляции динамики и функций септинов. Кроме того, динамика септина во время роста гифы полностью отлична от таковой у *S. cerevisiae*, показывая, что специфичная морфогенетическая программа имеет свои пути регуляции. Наконец, в противоположность тому, что происходит у *S. cerevisiae*, септины у *C. albicans* не модифицируются SUMO, хотя некоторые из взаимодействующих с септинами белков являются SUMO-модифицированными белками. Эти модифицированные белки главным образом локализованы около материнской клетки, как это видно на примере *S. cerevisiae*.

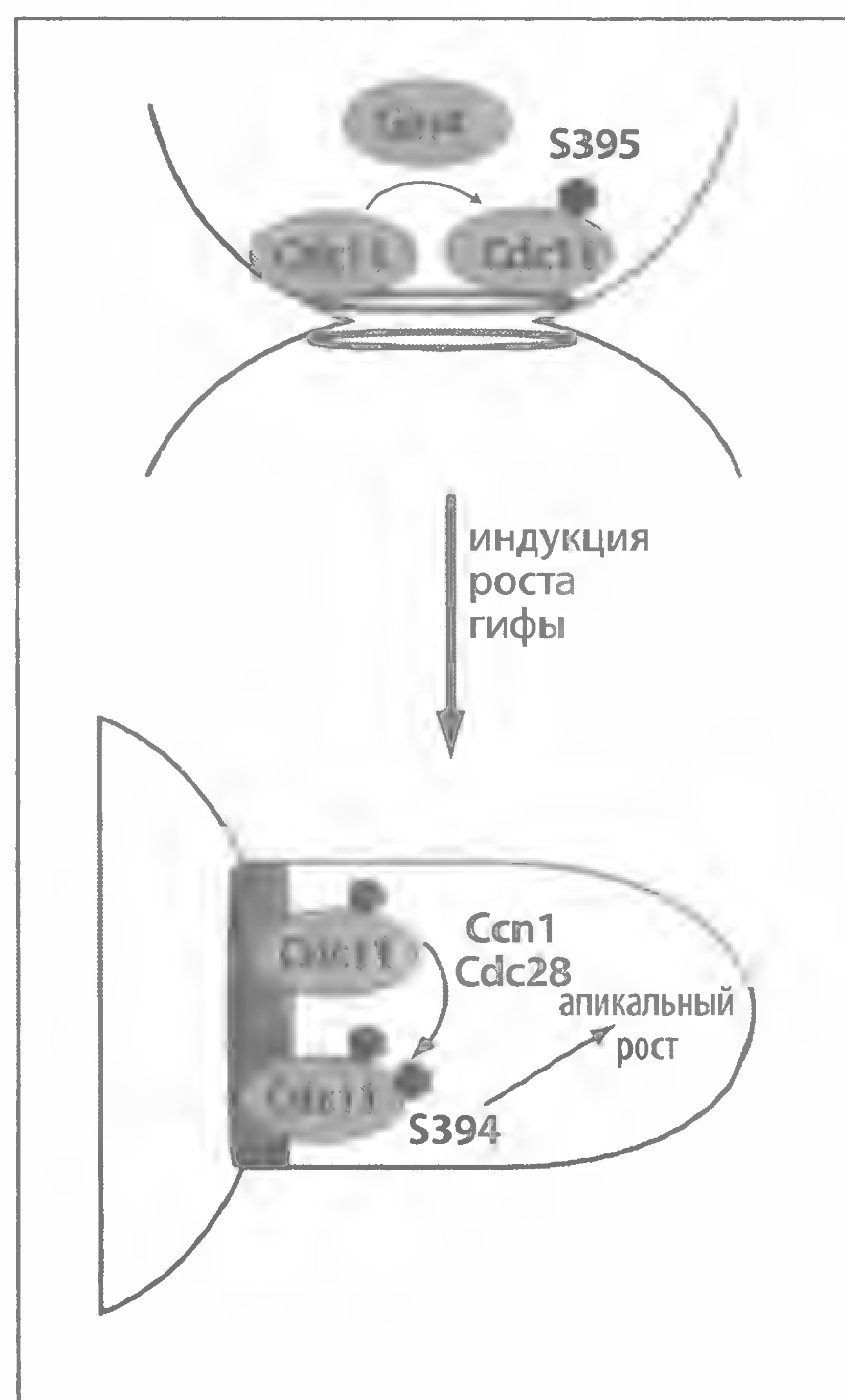


Рис. 56. Роль септинов в морфогенезе гифы *Candida albicans*.
В процессе дрожжевого роста Cdc11 фосфорилируется Gin4 по Ser395. При индукции гифы это фосфорилирование остатка служит как исходный сигнал сборки комплекса Ccn1-Cdc28, который фосфорилирует Ser394 на Cdc11, разрешая гифальный рост после первого септинового кольца (González-Novo et al., 2009).

Литература

Минин А.А., Кулик А.В. 2004. Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции // Успехи биологической химии. Т.44. С. 225–262.

Aist J. R. 1995. Independent nuclear motility and hyphal tip growth // Can. J. Bot. Vol.73: S122–S125.

Alvarez-Tabarés I, Pérez-Martin J. 2010. Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence // PLoS ONE. Vol.5. No.9. P.1–17.

Barnes G., Louie K.A., Botstein D. 1992. Yeast proteins associated with microtubules in vitro and in vivo // Molecular Biology of the Cell. Vol.3. P.29–47.

Berepiki A., Lichius A., Read N.D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi // Nature Reviews Microbiology. Vol.9. P.876–887.

Bertin A., McMurray M.A., Grob P., Park S-S, Garcia G., Patanwala I., Ng H-l, Alber T., Thorner J., Nogales E. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly // PNAS. Vol.105. No.24. P.8274–8279.

Bertin A., Nogales E. 2012. Septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae* // Communicative & Integrative Biology. Vol.5. No.5. P.503–505.

Byers B., Goetsch L. 1976. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast // J. Cell Biol. Vol.69. P.717–721.

Dagdas Y.F., Yoshino K., Dagdas G., Ryder L.S., Bielska E., Steinberg G., Talbot N.J. 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* // Science. Vol.336. No.6088. P.1590–1595.

Douglas L.M., Alvarez F.J., McCreary C., Konopka J.B. 2005. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi // Eukaryotic Cell. Vol.4. No.9. P.1503–1512.

East D.A., Mulvihill D.P. 2011. Regulation and function of the fission yeast myosins // Journal of Cell Science. Vol.124. No.9. P.1383–1390.

Evangelista M., Zigmond S, Boone C. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments // Journal of Cell Science. Vol.116. No.13. P.2603–2611.

Fagarasanu A., Rachubinski R.A. 2007. Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* // Current Opinion in Microbiology. Vol.10. P.528–538.

Fischer R. 2007. [The Cytoskeleton and polarized growth of filamentous fungi. 5] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition. The Mycota VIII. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag P.121–135.

Fischer R., Zekert N., Takeshita N. 2008. Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. MicroReview // Molecular Microbiology. Vol.68. No.4. P.813–826.

Fuchs U., Manns I., Steinberg G. 2005. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis* // Mol Biol Cell. Vol.16. No.6. P.2746–2758.

Fuchs F, Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // Journal of Cell Science. Vol.115. No.10. P.1931–1937.

Funaya C., Samarasinghe S., Pruggnaller S, Ohta M., Connolly Y., Müller J., Murakami H., Grallert A., Yamamoto M., Smith D., Antony C., Tanaka K. 2012. Transient structure associated with the spindle pole body directs meiotic microtubule reorganization in *Schizosaccharomyces pombe* // Current Biology. Vol.22. No.7. P.562–574.

Gladfelter A.S. 2006. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins // Nat Rev Microbiol. Vol.4. No.3. P.223–229.

Gladfelter A.S. 2010. Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi // Current Opinion in Microbiology. Vol.13. P.720–726.

González-Novo A., Vázquez de Aldana C.R., Jiménez J. 2009. Fungal septins: one ring to rule it all? // Cent. Eur. J. Biol. Vol.4. No.3. P.274–289.

Goode B.L., Rodal A.A. 2001. Modular complexes that regulate actin assembly in budding yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.4. P.703–712.

Grolig F., Moch J., Schneider A., Galland P. 2014. Actin cytoskeleton and organelle movement in the sporangiophore of the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus* // Plant Biology. Vol.16. Suppl.1. P.167–178.

Gundersen G.G., Gomes E.R., Wen Y. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization // Current Opinion Cell Biology. Vol.16. No.1. P.106–112.

Hartwell L. H. 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis // Exp. Cell Res. Vol.69, P.265-276.

Heath I.B. 1994a. [The cytoskeleton] // N.A.R. Gow, G.M. Gadd (eds.). The Growing Fungus. United Kingdom. London: Chapman & Hall. P.99–133.

Heath I.B. 1994b. [The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements and mitosis] // J.G.H. Wessels, F. Meinhardt (eds.). The Mycota. I. Growth, Differentiation and *Sexuality.* Germany. Berlin: Springer-Verlag. P.43–65.

Heath I.B. 2000. [Organization and functions of actin in hyphal tip growth] // C.J. Staiger, F. Baluska, D. Volkmann, P.W. Barlow (eds.). Actin: a Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions. The Netherlands. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. P.275–300.

Horio T., Oakley B.R. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans* // Mol Biol Cell. Vol.16. No.2. P.918–926.

Hubbard M., Kaminskyj S. 2007. Growth rate of *Aspergillus nidulans* hyphae is independent of a prominent array of microtubules // Mycol Progress. Vol.6. P.179–189.

Huisman S.M., Segal M. 2005. Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast – where's the catch? // Journal of Cell Science. Vol.118. No.3. P.463–471.

Inoue S., Turgeon B.G., Yoder O.C., Aist J.R. 1998. Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration // Journal of Cell Science. Vol.111. P.1555–1566.

Kollman J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A. 2011. Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol.12. P.709–721.

Konzack S., Rischitor P.E., Enke C., Fischer R. 2005. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans* // Mol Biol Cell. Vol.16. No.2: P.497–506.

Kopecka M., Gabriel M., Takeo K., Yamaguchi M. Svoboda A, Hata K. 2003. Analysis of microtubules and F-actin structures in hyphae and conidia development of the opportunistic human pathogenic black yeast *Aureobasidium pullulans* // Microbiology. Vol.149. P.865–876.

Lichius A., Berepiki A., Nick D. Read N.D. 2011. Form follows function — the versatile fungal cytoskeleton // Fungal Biology. Vol.115. P.518–540.

Martin S.G. 2009. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. Review // Trends in Cell Biology. Vol.19. No.9. P.447–454.

May K.M., Hyams J.S. 1998. The yeast cytoskeleton: the closer we look, the more we see // Fungal Genetics and Biology. Vol.24. P.110–122.

Osumi M., Konomi M., Sugawara T, Takagi T., Baba M. 2006. High-pressure freezing is a powerful tool for visualization of *Schizosaccharomyces pombe* cells: ultra-low temperature and low-voltage scanning electron microscopy and immunoelectron microscopy // Journal of Electron Microscopy. Vol.55. No.2. P.75–88.

Pan F., Malmberg R.L., Momany M. 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs // BMC Evolutionary Biology. Vol.7. No.103. P.1–17.

Riemann M., Büche C., Kassemeyer H.-H., Nick P. 2002. Cytoskeletal responses during early development of the downy mildew of grapevine (*Plasmopara viticola*) // Protoplasma. Vol.219. P.13–22.

Robinson A.J., Overy C., Kunji E.R.S. 2008. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry // PNAS. Vol.105. No.46. P.17766–17771.

Rodal A.A., Kozubowski L., Goode B.L., Drubin D.G., Hartwig J.H. 2005. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex // Molecular Biology of the Cell. Vol.16. P.372–384.

Sampson K., Heath I.B. 2005. The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans* // Microbiology. Vol.151. P.1543–1555.

Schott D, Huffaker T.and Bretscher A. 2002. Microfilaments and microtubules: the news from yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.5. P.564–574.

Steinberg G. 1998. Organelle transport and molecular motors in fungi // Fungal Genetics and Biology. Vol.24. P.161–177.

Steinberg G. 2006. Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. Review // Trends in Microbiology. Vol.15. No.1. P.1–21.

Straube A., Brill M., Oakley B.R., Horio T., Steinberg G. 2003. Microtubule organization requires cell cycle dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis* // Mol Biol Cell. Vol.14. P.642–657.

Walker S.K., Garrill A. 2006. Actin microfilaments in fungi // Mycologist. Vol.20. No.1. P.26–31.

Wendland J., Walther A. 2006. [Septation and cytokinesis in fungi. 6] // U. Kües, R. Fischer (eds.). The Mycota Growth, Differentation and Sexuality. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P.105–121.

Xiang X., Beckwith S.M., Morris N.R. 1994. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans* // Proc Natl Acad Sci USA. Vol.91. No.6. P.2100–2104.

Xiong Y., Oakley B.R. 2009. *In vivo* analysis of the functions of γ-tubulin-complex proteins // Journal of Cell Science. Vol.122. No.22. P.4218–4227.

Xiong Y., Oakley B.R. 2010. [The cytoskeleton in filamentous fungi .16] // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington, D.C.: ASM Press. P.209–223.

Xiang X., Plamanny M. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi // Current Opinion in Microbiology. Vol.6. P.628–633.

YamamotoA., Hiraoka Y. 2003. Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration // Journal of Cell Science Vol.116. No.22. P.4501–4512.

Глава 6.
Эндомембранная система грибной клетки[1]

6.1. Биологические мембраны

Биологические мембраны отличаются большим разнообразием. Они обеспечивают разделение внутреннего объема клетки на компартменты и участвуют в регуляции множества процессов.

Эндомембранная система (ЭС) эукариот представляет собой совокупность органелл, составляющих эндо- и экзосекреторные пути и включающих *эндоплазматический ретикулум* (ЭР), *аппарат Гольджи, эндосомы, мультивезикулярные тельца, вакуоли-лизосомы, транспортные вакуоли, плазматическую мембрану и транспортные интермедиаты, та-*

---

[1] Сокращения:

ГДФ — гуанозиндифосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
ГЭР — гладкий эндоплазматический ретикулум
МВТ — мультивезикулярное тело
ПЭ — поздние эндосомы
РЭ — ранние эндосомы
ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия
ЦМ — цитоплазматическая мембрана
ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум
ЭАГ — эквивалент аппарата Гольджи
ЭС — эндомембранная система
ЭР-трекер — краситель, имеющий высокое сродство к мембранам эндоплзмтического ретикулума.
ATG — сокр. англ. autophagy-related genes
CORVET — заякоривающий белковый комплекс
Cvt-путь (**c**ytoplasm to **v**acuole **t**argeting) — сходный с автофагией путь лизиса цитоплазмы при участии вакуолярного фермента аминопептидазы.
GPI якорь — гликозил-фосфоинозитольный якорь
PtdInsP — фосфорилированные формы фосфатидилинозитола
Rab и Arf — ГТФазы, факторы-идентификаторы
SNARE (от «**SNAP** (Soluble NSFAttachment Protein) **Re**ceptor») — большое семейство интегральных мембранных белков, облегчающие слияние мембран, участвующих в экзоцитозе грибов и животных. Белки **SNARE** делятся на две категории: везикулярные или **vSNAREs**, встроенные в мембрану транспортируемой везикулы, и целевые или **tSNAREs** (англ. target-SNAP receptors), которые определяют место связывания мембраны везикулы в воспринимающем компартменте, например, цитоплазмтической мембране.
GFP (англ. green fluorescent protein) — зеленый флуоресцентный белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его синим светом.
G_1, G_2 — стадии интерфазы клеточного цикла: G_1-фаза (от англ.*gap* — промежуток), или фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов: G_2-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.
ESCRT (от англ. **e**ndo**s**omal **s**orting **c**omplexes **r**equired for **t**ransport) — белковые комплексы цитоплазмы, которые играют важную роль в почковании внутриклеточных мембран, например, при формировании мультивезикулярных тел.
HOPS (от англ. **ho**motypic fusion and **p**rotein **s**orting (**HOPS**) complex) — белковый комплекс, который отвечает за слияние с мембраной вакуолей или лизосом.
vps (сокр. от англ. **v**acuole **p**rotein **s**orting) — семейство белков, участвующих в пути сортинга вакуолярных белков.
WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) белки являются медиаторами активированных белков Rac и Cdc42; повышение уровня экспрессии WASP-белков в культурах клеток вызывает полимеризацию актина

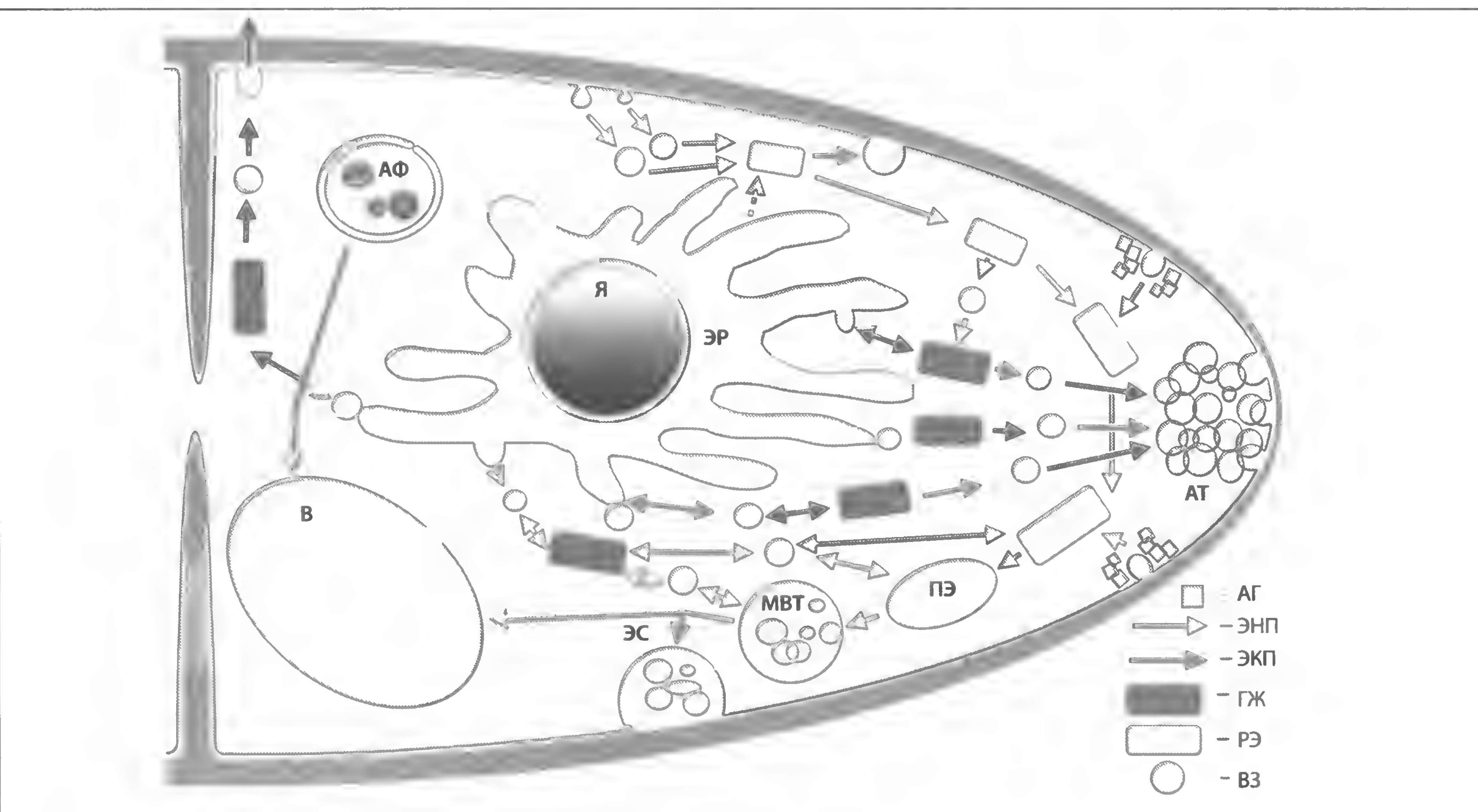


Рис. 57. Объединенная схема, отражающая предположительные связи между различными структурами эндомембранной системы (ЭС) грибов. Стрелками обозначены возможные переходы органелл одна в другую (созревание), слияние органелл или везикулярный транспорт от одной эндомембранной структуры к другой. Пунктирные стрелки — гипотетические переходы. Светлые стрелки соответствуют эндоцитозному пути и внутреннему транспорту. Темные стрелки – экзоцитозный путь. Обозначения на рисунке. АГ — актиновые глобулы, входящие в субапикальное кольцо, АТ — апикальное тельце, АФ — автофагосома, В — вакуоль, ВЗ — различные везикулы (первичные эндоцитозные, экзоцитозные, отвечающие за внутренний транспорт), ГЖ — цистерны Гольджи, МВТ — мультивезикулярное тело, ПЭ — поздняя эндосома, РЭ — ранние эндосомы, ЭР — эндоплазматический ретикулум, ЭС — экзосома, Я — ядро. Изображена схема апекса мицелиального гриба с простой септой (мембранный аппарат септы не отражен) (Камзолкина и др., 2014).

кие как везикулы, а также экзосомы (рис. 57). Эти окруженные мембраной компартменты образуют комплекс внутриклеточной системы, которая может составлять высокий процент от общего объема клетки. Развитие всесторонней клеточной компартментализации является одним из наиболее значимых достижений в эволюции от прокариотов к эукариотам. Такое усовершенствование внутренних мембран позволило перевести многие биохимические процессы, которые протекали на поверхности клетки у прокариот, внутрь клетки. Благодаря развитию внутренней системы мембран в клетке эукариот, увеличилось ее внутреннее пространство, средний объем эукариотической клетки примерно в 100 раз больше объема клетки прокариот.

6.2. Секреторный путь и его органеллы

У про- и эукариот встречаются разнообразные механизмы секреции. Наиболее изучена секреция белков. Секреция может происходить посредством АТФ-зависимых мембранных транспортеров, локализованных в плазмалемме, либо экзоцитозом. Основным путем, обеспечивающим экзоцитоз белков у эукариот, является их везикулярный транспорт из эндоплазматического ретикулума через систему транс-Гольджи везикул к транспортным везику-

лам, которые доставляются к периферии клетки и сливаются с плазматической мембраной, освобождая содержимое путем экзоцитоза (рис. 57).

За редким исключением рост у мицелиальных грибов апикальный. Поляризованный экзоцитоз у мицелиальных грибов обеспечивает кончик гиф материалом для построения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, а также необходимыми для такого биосинтеза секретируемыми ферментами. Процесс апикального роста у септированных грибов связан с организованными в кластер везикулами (апикальное тельце или Spitzenkörper, рис. 57).

Однако экзоцитоз у мицелиальных грибов происходит не только в апикальных частях гиф, обеспечивая верхушечный рост, но и в других зонах мицелия, участвуя, например, в формировании боковых ответвлений, интеркалярном росте, построении септ, секреции вторичных метаболитов и адгезивов, вторичном утолщении клеточной стенки. Возможен также экзоцитоз в периплазматическое пространство. Так, у *A. oryzae* происходит накопление секретируемого белка α-амилазы в периплазматическом пространстве между септой и клеточной стенкой. Известно, что клетки дрожжей *S. cerevisiae* постоянно секретируют много ферментов, которые остаются локализованными в периплазме.

6.2.1. Эндоплазматический ретикулум (ЭР, ER)

Эндоплазматический ретикулум представляет собой протяженную замкнутую трехмерную мембранную структуру, построенную из сообщающихся трубкообразных полостей, называемых цистернами. Цистерны формируют разветвленную в разной степени единую систему, они расположены в цитоплазме под цитоплазматической мембраной и образуют контакты с ядерной оболочкой (рис. 57). Внутреннее пространство ЭР или *люмен* отграничено от цитоплазмы одинарной мембраной.

Различают *шероховатый* и *гладкий* эндоплазматический ретикулум. Мембраны шероховатого ЭР усеяны множеством рибосом, в то время как гладкий ЭР не имеет связанных рибосом.

На рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) происходит синтез белков, которые функционируют в составе мембран секреторного пути или в качестве секретируемых белков. Остальные белки синтезируются в цитоплазме на рибосомах, не связанных с мембранами ЭР. Белки, синтезированные на ШЭР, претерпевают посттрансляционные модификации (созревание). Они либо остаются внутри шероховатого ЭР в виде растворимых или мембранных белков, либо транспортируются с помощью везикул (отпочковываются от цистерн ЭР) в аппарат Гольджи (сливаются с цистернами Гольджи).

Гладкий ЭР (ГЭР) принимает участие в синтезе и перемещении липидов (в том числе липидов мембран митохондрий и пероксисом), трансформации *ксенобиотиков*, запасании ионов кальция. Он занимает в клетке грибов сравнительно небольшой объем. Биосинтез липидов осуществляется ферментами, закрепленными на мембранах гладкого ЭР. В мембранах ГЭР локализованы кальциевые каналы, для ГЭР характерна высокая концентрация Ca^{2+}-связывающих белков.

ЭР — динамичная система мембран, имеющая некоторые особенности распределения и реорганизации у разных таксонов грибов. Рассмотрим морфологию и распределение ЭР на примере дрожжеподобных и мицелиальных грибов.

Организация и динамика грибного ЭР исследовалась при изучении живых клеток с экспрессией флуоресцентных белков. Сеть ЭР у фитопатогенного гриба *Ustilago maydis*, проявляющего дрожжеподобный рост, представлена ветвящимися трубочками, расположенными по периферии клетки (рис. 58), а у мицелиального гриба *Aspergillus oryzae* — почти неветвящимися трубочками, ориентированными параллельно оси гифы (рис. 59). Ограниченное распространение ЭР было исследовано с использованием витальных красителей,

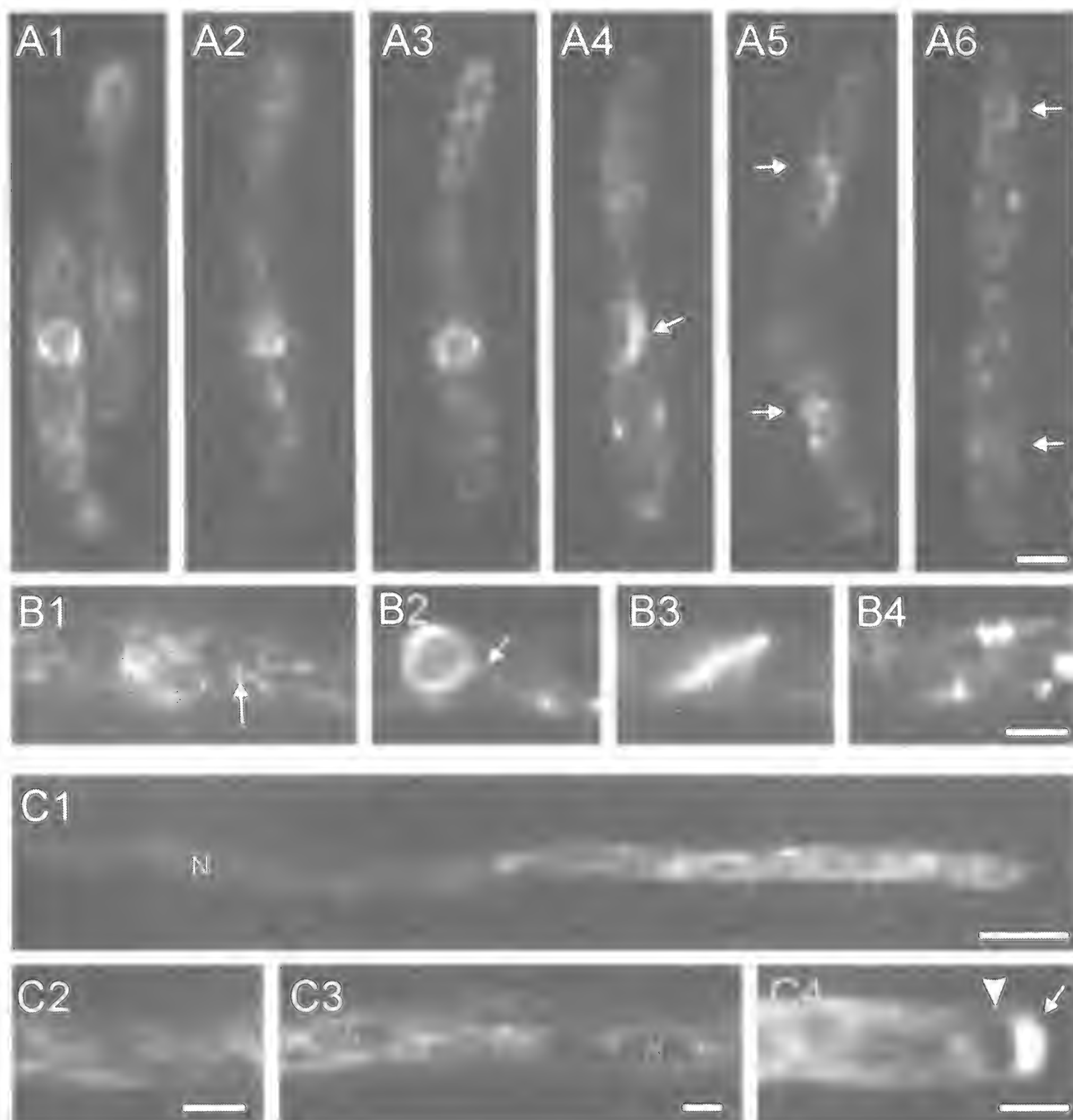


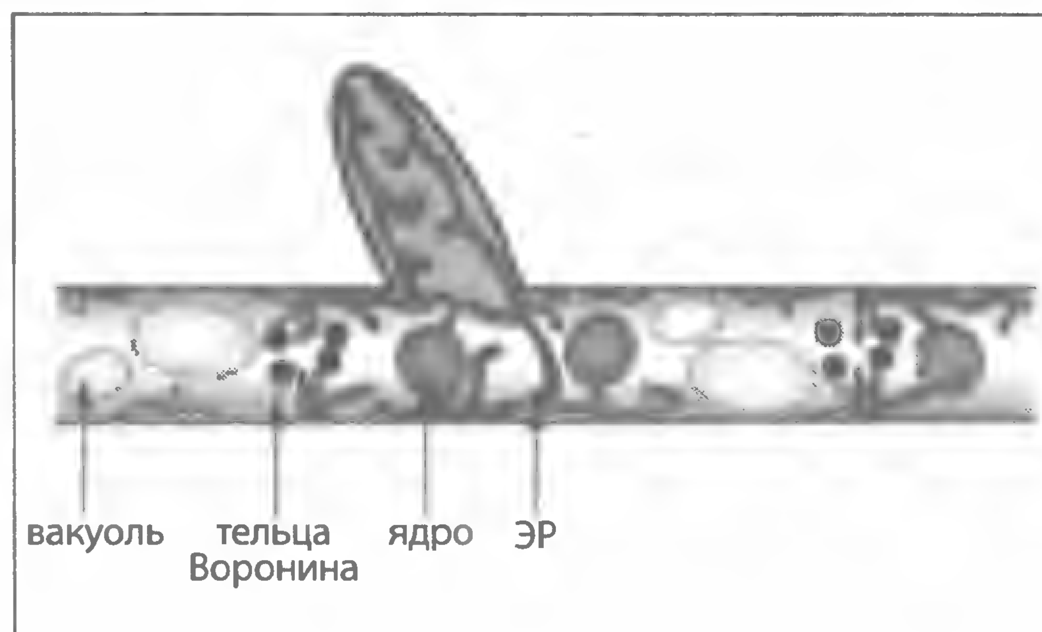
Рис. 58. Эндоплазматический ретикулум у *Ustilago maydis*.

А ЭР на разных стадиях клеточного цикла. Клетки дикого штамма FB1EG с экспрессией ЭР-GFP белка содержат кортикальную сеть в материнской и дочерней клетках (A1). Сеть локализована у кортекса клетки (A2) и ядерной оболочки, что четко видно в материнской клетке (A1, A2 и A3 показывают разные фокальные планы одной клетки). В процессе ранних стадий митоза периферическая сеть сохраняется (A4), в то же время ядерная оболочка исчезает. Заметно, что многие материнские клетки содержат локальный лентовидный ЭР (A4, стрелка). Ядерная оболочка появляется в телофазе у материнской и дочерней клеток (A5, стрелки), когда ядерная ДНК еще конденсирована. Наконец, оба ядра занимают свое положение в материнской и дочерней клетках соответственно (A6, стрелки). Масштабный отрезок (A1–A6) 3 мкм.

В. Детали организации ЭР в гаплоидных клетках. Трубочки ЭР обычно ветвятся и имеют ярко окрашенные пятна в точках ветвления (B1, стрелка). Периферическая сеть в контакте с ядерной оболочкой (B2, стрелка). В процессе митоза белок ЭР-GFP накапливался в виде лентоподобной структуры в материнской клетке (B3) и сохраняющейся сети на периферии клетки (B4). Масштабный отрезок (B1–B4) 2 мкм.

С. Организация ЭР в дикариотической гифе. Тубулярный ЭР у трансформированного штамма с ЭР-GFP (C1, C2, C3), локализация вокруг ядер (C1, C3, ядра помечены “N”). Градиент ЭР-GFP в апикальном районе гифы (C1). Этот градиент часто отсутствует в апикальном своде (C4, большая стрелка) и очень яркий район наблюдается в самом кончике (C4, стрелка). Масштабный отрезок 5 мкм (C1) и 2 мкм (C2–C4) (Wedlich-Söldner et al., 2002).

Рис. 59. Схема дифференциального распространения сети эндоплазматического ретикулума (ЭР) в мицелии *Aspergillus oryzae*. (Maruyama, Kitamoto, 2007)



таких как ЭР-tracker и коньюгированный с флюорофором блефельдин А. Было обнаружено, что ЭР — очень подвижная органелла. В поляризованных грибных клетках поддерживается определенное распределение органелл эндомембранной системы.

У дрожжей *S. cerevisiae*, также как у растений, внутриклеточная сеть ЭР представлена протяженной системой неветвящихся цистерн и трубочек, связанных с ядерной мембраной. Трубочки локализованы преимущественно по периферии клетки, где они тесно связаны между собой и с плазматической мембраной.

У диморфного гриба *U. maydis* наблюдается следующее распределение ЭР в клетках дрожжевой (гаплоидной) и мицелиальной (дикариотической) стадий (рис. 58). В фазе роста гаплоидных клеток сеть ветвящихся трубочек ЭР локализована в периферической части клетки и вокруг ядра (рис. 58А, В). Во время деления клеток сохраняется периферическая сеть, а скопление ЭР вокруг ядра концентрируется в материнской клетке. Система ЭР вокруг ядра восстанавливается в конце деления (рис. 58А). Было показано, что для подвижности ЭР необходимы цитоплазматический динеин и микротрубочки. Для дикариотической гифы характерен неветвящийся трубчатый ЭР, ориентированный параллельно оси гифы (рис. 58С). Последний тип распределения ЭР в клетке характерен для большинства мицелиальных грибов.

Исследования ультраструктуры мицелиальных грибов (*Magnaporthe grisea*, *Fusarium verticillioides*) выявило следующее распределение ГЭР и ШЭР в гифе: цистерны ЭР часто собраны в параллельные пучки и обнаружены по всему радиусу грибной гифы В вегетативной гифе большинство мембран ЭР содержит связанные с мембраной рибосомы, часто собранные в полирибосомы (ШЭР). Менее обычны места скопления гладкого ЭР, принимающего участие в образовании парентосомы вокруг септальной поры базидиомицетов, и периферической сети ЭР (рис. 60). Гладкий эндоплазматический ретикулум может чередоваться с шероховатым ЭР. Выделяют переходный ЭР. Он состоит из гладкого ЭР, локализованного по соседству с индивидуальными цистернами Гольджи, и участвует в переносе и освобождении материала от ЭР к аппарату Гольджи. Таким образом, переход-

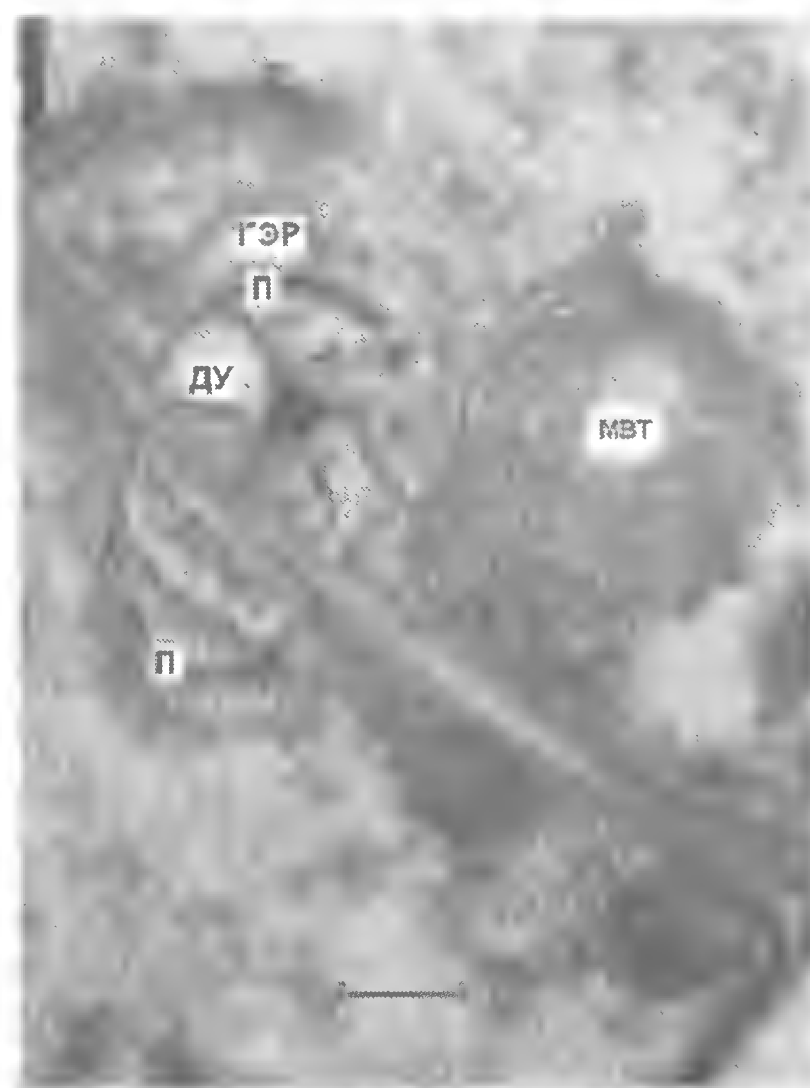


Рис. 60. Долипоровая септа *Agaricus bisporus* Bs 94. Обозначения: ГЭР — цистерна гладкого эндоплазматического ретикулума, окружающая парентосому, ДУ — долипоровое утолщение, П — парентосома, МВТ — мультивезикулярное тело. Масштабный отрезок 300 нм.

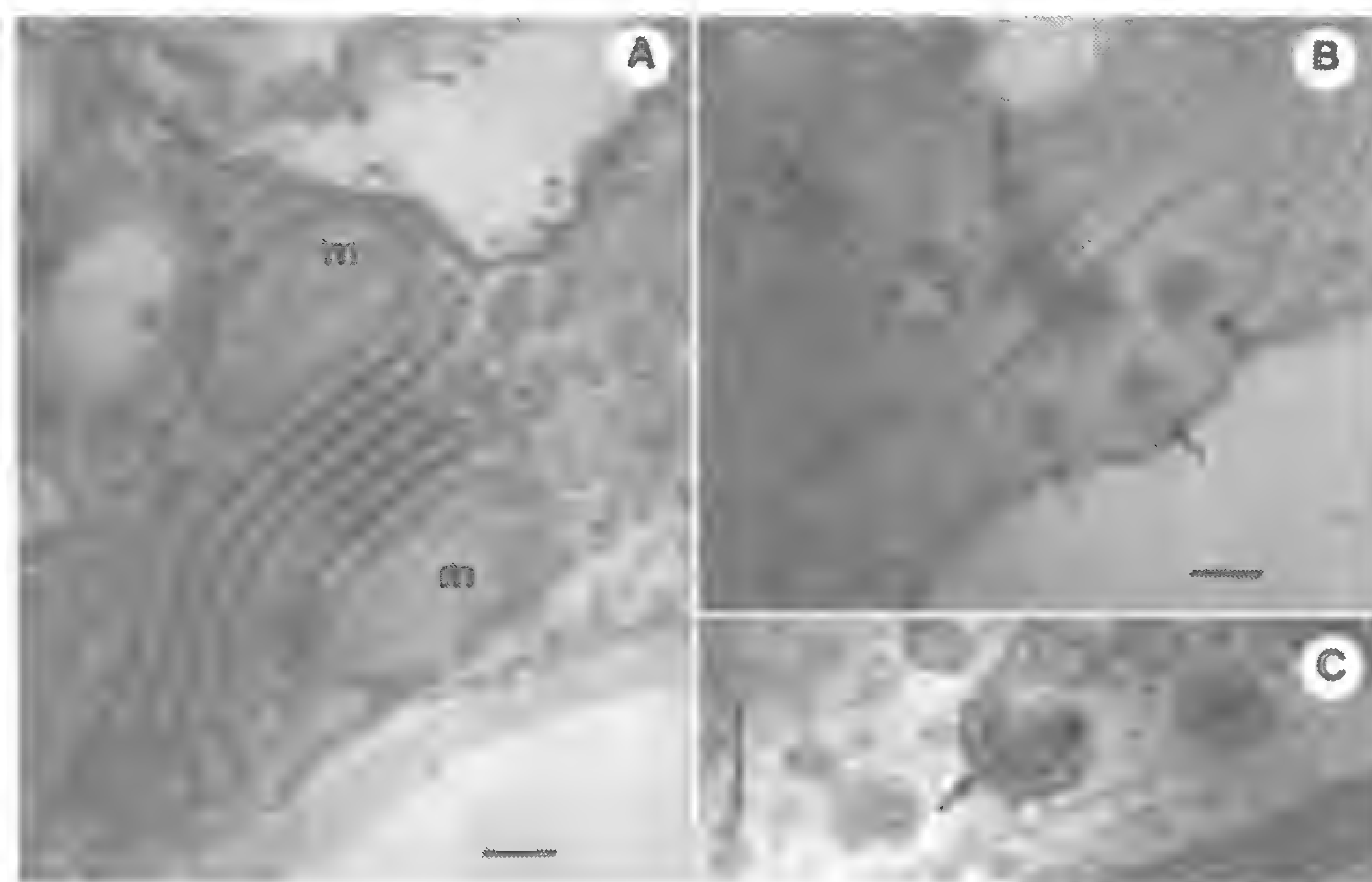


Рис. 61. Симплехосома и атрактосомы у *Basidiopycnis hyalina*. А. Симплехосома состоит из стопки параллельных цистерн ЭР, часто контактирует с митохондрией (m). В. Септальный аппарат с зоной свободной от органелл, ограниченной атрактосомами (стрелки). С. Медианный срез через атрактосому (стрелка), на котором видно, что атрактосома состоит из закрученной цистерны. Масштабный отрезок 0,1 мкм (Oberwinkler et al., 2006).

ный ЭР может играть существенную роль в биогенезе и формировании аппарата Гольджи у *S. cerevisiae* и, возможно, мицелиальных грибов.

ЭР может претерпевать структурную реорганизацию. Так, перед прорастанием спор грибов, сопровождающегося их гидратацией, его объем сильно увеличен. У фитопатогенного гриба *Uromyces appendiculatus* ЭР претерпевает структурную реорганизацию в процессе патогенеза: у гаустории этого биотрофного гриба в ответ на фитогормоны хозяина происходит формирование трубчато-везикулярной сети ЭР с преимущественным развитием трубочек.

Реорганизация ЭР происходит и при формировании атрактосом и симплехосом у хищных грибов. *Атрактосомы* образованы из цистерны ЭР путем ее закручивания в пределах ограниченного пространства и формирования глобулярного компартмента (рис. 61С). *Симплехосомы* — образованы системой параллельно расположенных цистерн ЭР (рис. 61А).

6.2.2. Эквивалент аппарата Гольджи

Аппарат Гольджи представляет собой продолжение мембран ЭР и является местом созревания и сортировки белков и липидов. Сходно с растениями аппарат Гольджи у грибов участвует в формировании комплекса полисахаридов клеточной стенки. Мобильность аппарата Гольджи у некоторых клеток растений и грибов может быть связана с главной его функцией — секрецией полимеров клеточной стенки; около 80% активности Гольджи идет на продукцию комплекса полисахаридов.

Структура аппарата Гольджи у грибов отличается от структуры аппарата Гольджи у растений и животных. Самое главное отличие заключается в том, что у настоящих грибов в отличие от растений и высших животных отсутствуют *стопки расплющенных цистерн*, или *диктиосомы,* а имеются разбросанные в цитоплазме цистерны, пластины, везикулы. В связи с этим мы будем называть аппарат Гольджи у грибов эквивалентом аппарата Гольджи (ЭАГ). У мицелиальных грибов не показано присутствие матриксных белков гольджинов.

Грибы по строению аппарата Гольджи близки к другим низшим эукариотам — беспозвоночным животным. Некоторые простейшие *Giardia* и *Entamoeba*, например, имеют систему Гольджи, состоящую из изолированных везикул. Несмотря на простое строение аппарата Гольджи, эти примитивные эукариоты располагают базовой молекулярной машиной, необходимой для разделения биохимических процессов в ЭР и ЭАГ, обеспечивающих доставку белков и полисахаридов к поверхности клетки.

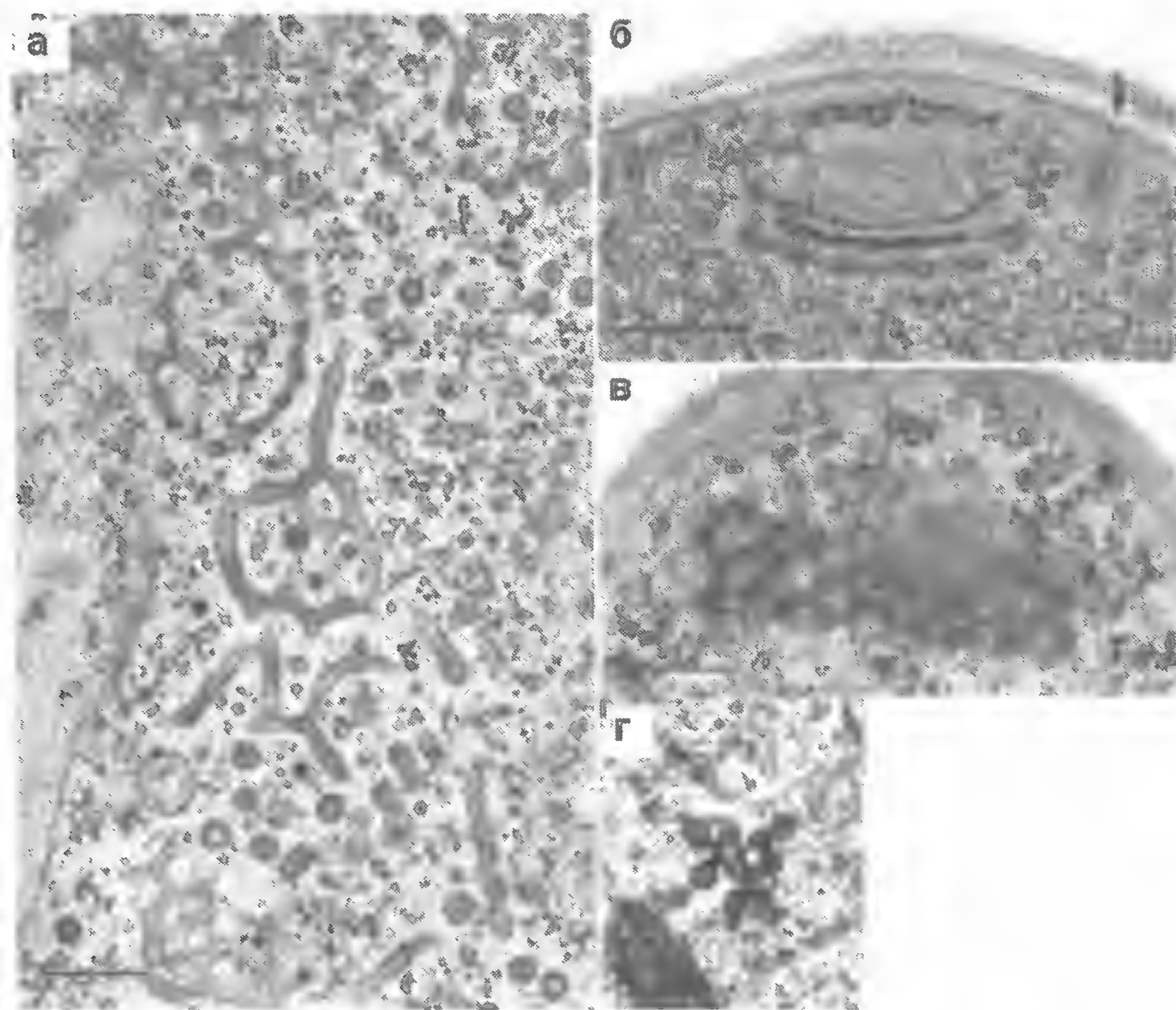
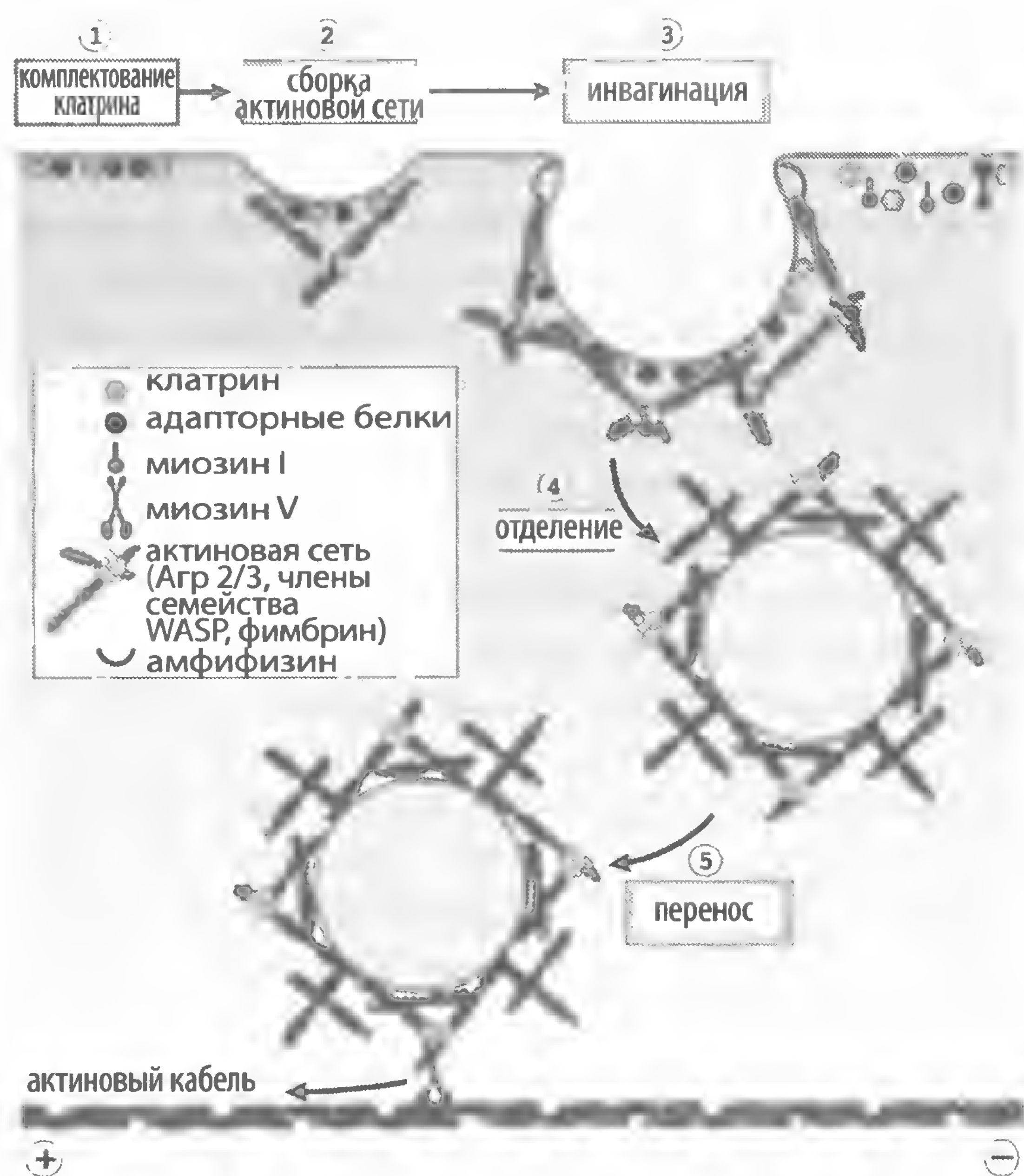


Рис. 62. Эквивалент аппарата Гольджи у грибов.
а. ЭАГ в гифе *Aspergillus nidulans*. Система трубчатых цистерн и отсутствие стопок цистерн — отличительная черта Гольджи у мицелиальных грибов.
б–в. Продырявленные цистерны Гольджи у дрожжей *Pichia pastoris*, наблюдаются также стопки цистерн (б);
г. Цистерны Гольджи у базидиомицета *Helicobasidium mompa* характеризуются вздутиями на кончиках
Все препараты приготовлены по методу замораживания-замещения. *Стрелка* указывает на инвагинацию плазматической мембраны. Масштабный отрезок 250 нм (а–в), 500 нм (г) (Bourett et al., 2007).

Рис. 63. Формирование клатрин-зависимой эндоцитозной везикулы с участием актина, миозина I и адапторных белков эндоцитоза. Накопление клатрина около плазматической мембраны запускает аккумуляцию эндоцитозных адапторных белков (шаг 1). Зависимое от актина впячивание цитоплазматической мембраны и далее сопровождается накоплением и активацией комплекса Arp2/3 белками сем. WASP и формированием сети актиновых микрофиламентов, связанной поперечными связями с фимбрином (шаг 2). Дальнейшая сборка актина вместе с активностью амфифизина и миозина I способствует инвагинации и отщеплению эндоцитозной везикулы от цитоплазматической мембраны (шаги 3 и 4) и ее погрузке на актиновые микрофиламенты неизвестным механизмом (шаг 5). Компоненты актиновых глобул остаются на клеточном кортексе, включая эндоцитозные адапторные белки и миозин I. Везикулы быстро перемещаются вдоль актиновых микрофиламентов в обоих направлениях. Роль миозинов класса V в этом способе транспорта нуждается в подтверждении. Так как миозины класса V перемещаются исключительно по направлению плюс конца микрофиламентов, предполагается, что актиновые нити поляризованы (Berepiki et al., 2011).



В отличие от ЭР, который сохраняется на протяжении всего клеточного цикла, ЭАГ у грибов исчезает во время деления клеток и образуется *de novo*.

В цитоплазме кончика гифы мицелиального аскомицета *Aspergillus nidulans* ЭАГ представлен продырявленными полыми сферами или пластинами (рис. 62а). Часто подобные пластины наблюдаются в районе септ у базидиомицетов (*Agaricus* spp., *Pleurotus* spp.).

У базидиомицетов ЭАГ представлен взаимосвязанной сетью цистерн, часто заканчивающихся характерным расширением (рис. 62г), и везикулами. Похожая трубчатая система была описана в гифе арбускулярной микоризы, но такие структуры неизвестны у аскомицетов.

У дрожжей *S. cerevisiae* также отсутствуют типичные диктиосомы. Дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* и *Pichia pastoris* обладают усовершенствованным типом ЭАГ, состоящим из стопок параллельных трубочек (рис. 62б, в).

Отсутствие стопок цистерн Гольджи у мицелиальных грибов может быть следствием очень быстрого *антероградного* движения мембран через секреторный путь. Мобильность аппарата Гольджи растений, основанная на актомиозине, отсутствует у клеток животных и неизвестна у мицелиальных грибов.

6.2.3. Транспортные везикулы и экзосомы

Везикулы — небольшие клеточные органеллы, окруженные одинарной мембраной; в них запасаются или транспортируются питательные вещества. Эндоцитозные везикулы формируются путем отпочковывания от цитоплазматической мембраны (ЦМ) (рис. 63). В этом процессе у почкующихся дрожжей показано участие покровного белка — клатрина, который формирует оболочку везикулы и способствует освобождению от ЦМ. У мицелиальных грибов в этом процессе задействованы актиновые глобулы (см. главу «Цитоскелет»). Экзоцитозные везикулы формируются в секреторном пути и отпочковываются от мембран ЭР и/или эквивалента Гольджи. Везикулы выполняют разные функции в клетке, в том числе транспортную. В транспорте эндомембранных компартментов внутри клетки принимают участие моторные белки. У грибов такую роль выполняют динеины, миозины и кинезины. Они узнают мембрану-мишень с помощью факторов-идентификаторов и перемещают везикулу в место назначения по микротрубочкам или актиновым кабелям.

Основные события, которые происходят со структурами ЭС во время транспорта мембранных компартментов и морфогенеза мембранных органелл — формирование транспортных везикул, то есть мембранных пузырьков, на поверхности мембранного компартмента или инвагинацией внутрь такого компартмента (в т.ч. эндоцитоз первичных везикул из плазмалеммы); транспорт везикул с помощью элементов цитоскелета; слияние вакуолярных органелл как гомотипичное (слияние вакуолей в более крупную, слияние ранних эндосом (РЭ) с формированием поздних эндосом (ПЭ) и т.д.), так и гетеротипичное (например, включение транспортной везикулы в ЭР, Гольджи, эндосомы и т.д.). Очевидно, сложнейший процессинг эндомембранных структур происходит при участии множества специфических белков и других факторов. Все факторы, принимающие участие в везикулярном транспорте и морфогенезе структур ЭС, можно условно разделить на три категории.

Первая категория — факторы-идентификаторы. Везикулярный транспорт строго адресован и ЭС — важнейшая система распределения в клетке различных веществ. Поэтому все органеллы ЭС должны быть четко идентифицируемы белками, участвующими в эндомембранном транспорте и морфогенезе. Важнейшие факторы-идентификаторы и у грибов (изученных), и у других эукариот — Rab и Arf (ГТФазы), а также специфические липиды (наиболее исследованы разные фосфорилированные формы фосфатидилинозитола (PtdInsP)). Rab и Arf семейства белков — ГТФазы малой массы, в форме, связанной с ГТФ, они присоединены к поверхности мембраны, в ГДФ-форме — высвобождаются в цитозоль. Многие из данных ГТФаз специфичны для индивидуальных эндомембранных органелл,

что позволяет идентифицировать такие органеллы через определенные белки клетки. Например, мембраны РЭ маркированы Rab5, а ПЭ — Rab7.

PtdIns фосфорилируется в разных положениях инозитольного кольца и некоторые из таких форм PtdInsP маркируют определенные структуры ЭС. Так, PtdIns(3) P содержится в мембранах РЭ, при переходе РЭ в ПЭ он модифицируется в PtdIns(3, 5)P_2.

Вторая категория — периферические мембранные белки. Большинство белков, участвующих в мембранном транспорте, не имеют трансмембранного домена и присоединяются подобно Rab к поверхности мембраны. Основных групп таких периферических белков три — покровные белки, моторные белки и заякоривающие белки. Покровные белки «одевают» поверхность мембраны в месте формирования везикулы, образуют каркас для формирующейся везикулы и способствуют включению в мембрану других белков. После отшнуровки везикулы покровные белки уходят из нее. Таким покровным белком является, например, *клатрин*. Он участвует в формировании везикул эндоцитозного пути у животных. У грибов выявлены два класса покрытых везикул, то есть везикул, окруженных сетью из филаментов актина: одни с диаметром 100–180 нм и другие, более представленные, с диаметром 50–80 нм. Следует отметить, что покрытые везикулы часто встречаются в 2–3 мкм ниже верхушки гиф, но очень редко в самой верхушке.

Моторные белки, такие как кинезины, динеины и миозины представляют собой АТФазы, которые принимают участие в транспорте органелл вдоль структур цитоскелета — микротрубочек или микрофиламентов (подробно см. в главе «Цитоскелет»). Заякоривающие белки содержат на С-конце гликозил-фосфатидилинозитольный якорь (GPI якорь), локализованный в плазматической мембране. Они связаны с β-1,6-глюканом клеточной стенки через фосфоэтаноламин-маннозный мостик GPI якоря. Наиболее изученным белком этой группы является α-агглютинин.

Весьма специфичными везикулами являются *хитосомы*. Они переносят фермент хитинсинтазу в зимогенной форме (90–96% у *Mucor rouxii*), имеют небольшую величину по сравнению с большинством других везикул (40–70 нм в диаметре) и состоят примерно на одну треть из липидов и на две трети из белков. Полипептидный состав хитосом *M. rouxii* представляет собой комплекс молекул с различной молекулярной массой, из которых преобладающим является полипептид с мол. массой 55 кДа. Пока, правда, остается неясным, связан ли этот полипептид с хитинсинтазой или нет.

Третья категория факторов, участвующих в везикулярном транспорте — интегральные мембранные белки – SNAREs, которые принимают участие в специфическом слиянии мембран.

Помимо классического экзоцитозного пути белков (через ЭР и транс-Гольджи везикулы) существуют и другие варианты экзоцитоза, например, при участии экзосом. В процессе биогенеза экзосом у грибов предполагают участие мультивезикулярных тел (МВТ). Обычно в эндоцитозном пути (см. далее) МВТ взаимодействуют с вакуолями-лизосомами. Но также показано, что МВТ могут сливаться с плазмалеммой, освобождая внутренние везикулы во внеклеточное пространство экзоцитозом, или сливаются с ЦМ при формировании септы (рис. 57, 60).

Еще в 70-х годах прошлого века было показано, что клетки *Cryptococcus neoformans*, окруженные капсулярным материалом, транспортируют везикулы-экзосомы из клетки через клеточную стенку во внешнюю среду. Авторы предположили, что таким образом происходит секреция полисахаридов глюкуроноксиломаннана и галактоксиломаннана, синтезируемых в цитоплазме. Лишь через два десятка лет другие исследователи подтвердили данную гипотезу, продемонстрировав с помощью иммунноголдинга наличие глюкуроноксиломаннана в везикулах, мигрирующих от плазмалеммы через клеточную стенку. В таких везикулах-экзосомах, кроме глюкуроноксиломаннана, обнаружены глюкозилцерамид (гликосфинголипид, являющийся компонентом мембран везикул и используемый как маркер таких везикул) и 76 различных белков. Среди последних - белки теплового шока, супероксиддисмутаза, регуляторы сигнальной трансдукции, антиоксиданты, цитозольные белки и

ряд различных ферментов. Причем примерно треть белков, идентифицированных в везикулах *C. neoformans,* обнаруживают (их гомологи и аналоги) в экзосомах млекопитающих.

Транспорт экзосом от плазмалеммы через клеточную стенку во внешнюю среду описан и у других патогенных грибов, например, у *Candida albicans* и у *Histoplasma capsulatum*.

6.3. Эндоцитозный путь и его органеллы

Эндоцитозный путь включает этап поглощения биомолекул (груз), в течение которого от плазматической мембраны в цитозоль отпочковываются везикулы, и доставку эндоцитозного материала к вакуолям-лизосомам через эндосомальную систему, которая обычно делится на «ранние» и «поздние» эндосомы или мультивезикулярные тела. Эндоцитозный компонент ЭС грибов — комплекс связанных между собой мембранных органелл, выполняющих следующие функции: поглощение биомолекул из окружающей среды с целью питания гриба, участие в сигнальных путях (в т.ч. везикулярная рецепция сигнальных лигандов), удаление и деградация белков и других компонентов плазмалеммы, утилизация белков сигнальных путей, транспорт белков к эквиваленту комплекса Гольджи и другие.

У мицелиальных грибов эндоцитоз играет ключевую роль в процессе роста кончика гифы, так как апикальный рост гифы происходит благодаря объединению двух процессов — транспорта секреторных мембранных структур в апикальный район (апикальный экзоцитоз), которые обеспечивают увеличению площади поверхности плазмалеммы и клеточной стенки, и субапикального эндоцитоза, обеспечивающего растущий кончик питательными веществами (рис. 57).

Сравнение эндоцитозных путей грибов и животных выявляет большое сходство: процессы внутреннего мембранного транспорта имеют консервативный характер. Среди отличий, например, начальный этап формирования эндоцитозных везикул: у мицелиальных грибов везикулы формируются без участия клатрина. У животных нет как таковых вакуолей, вследствие чего конечное слияние МВТ и автофагосом происходит с лизосомами.

В то же время эндоцитозные пути грибов и животных имеют некоторые отличия от растительного эндоцитоза. Так, роль ранних эндосом у растений выполняет транс-сеть аппарата Гольджи.

6.3.1. Эндосомы (ранние и поздние), мультивезикулярные тела.

Современное понятие эндоцитоза тесно связано с *эндосомами*. Термин эндосомы ввели в 80-е гг. прошлого века для клеток животных, и примерно с 2000 г. данный термин используют в микологии. Под эндосомами понимают совокупность мембранных структур, занимающихся эндоцитозным транспортом от плазмалеммы к МВТ (собственно, МВТ также теперь принято называть поздними эндосомами). Для животных показано, что эндосомы представляют собой гетерогенную популяцию вакуолеподобных образований и трубочек, к которым от цитоплазматической мембраны транспортируются в везикулах рецепторы плазмалеммы и связанные при сигнальном эндоцитозе с рецепторами *лиганды*, а также внеклеточные растворы при других формах эндоцитоза. Продемонстрировано участие эндосом в регуляции многих физиологических процессов внутри клетки (транспорт, перераспределение макромолекул и многие другие).

Ранние эндосомы у мицелиальных грибов были впервые описаны у диморфного гриба *U. maydis*. Позже сходные структуры были обнаружены у *A. nidulans* и *A. oryzae*.

Используя различных грибных мутантов с нарушением эндоцитоза, удалось показать, что в отсутствие полноценного эндоцитоза полярность роста гиф нарушается. Впячивание плазмалеммы и формирование эндоцитозных везикул с последующим сли-

янием их в РЭ может происходить в различных участках мицелия, наиболее активны в данном плане кончики гиф, в апикальных клетках нередко бывает субапикальная зона наиболее интенсивного эндоцитоза — субапикальное кольцо. Субапикальному кольцу соответствуют кольцо актиновых глобул (G-актин, собранный плотным кольцом чуть ниже кончика гифы) и кольцо динеина (по-крайней мере, так у *A. nidulans* и *U. maydis*, но не в любых гифах). Кольцо актиновых глобул, видимо, непосредственно участвует в загрузке везикул, а динеиновый резервуар обеспечивает транспорт РЭ от апекса вглубь клетки. Дело в том, что в кончиках грибных гиф транспорт РЭ полярен и двунаправлен. По одним микротрубочкам, расположенным вдоль длинной оси клетки, РЭ транспортируются в апикальную зону, по другим микротрубочкам — в базальную часть клетки. Плюс концы микротрубочек достигают эндоцитозного (динеинового) кольца. У *A. nidulans* и *U. maydis* кинезин-3 переносит РЭ по микротрубочкам к динеиновому кольцу, динеин транспортирует РЭ в обратном направлении. Значительная скорость перемещения (~ 3 мкм/с) РЭ — отличительная черта мицелиальных грибов от других организмов. Мобильность грибных РЭ также отличает их от ПЭ, поскольку ПЭ — структуры более или менее статичные.

В последние годы изучение эндосомального пути сосредоточилось на молекулярно-генетическом анализе механизмов перераспределения матричных и мембранных белков в эндосомах и МВТ и их биогенезе у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*. У дрожжей нет активного двунаправленного транспорта РЭ, сопряженного с апикальным экзоцитозом и ростом кончиков гиф, и, соответственно, нет зависимости преобразования РЭ в МВТ от прохождения РЭ через апикальную зону. Общая схема дрожжевого эндоцитозного пути выглядит так: эндоцитоз начинается около плазмалеммы, формируются первичные эндоцитозные везикулы, которые представляют собой пузырьки диаметром 30–50 нм. Затем первичные везикулы могут сливаться между собой и с компартментом трубчато-везикулярной природы, образуя РЭ. РЭ дрожжей содержат трубчатый материал, локализованы в непосредственной близости от периферии клетки и, как у мицелиальных грибов, способны к *рециклингу* — обратному слиянию с плазмалеммой. РЭ маркированы Rab5. Если содержимое РЭ распознается как материал, подлежащий деградации, происходит запуск трансформации РЭ в ПЭ. Rab5 при этом способствует фосфорилированию PtdIns в PtdIns(3) P, что служит сигналом для начала формирования ПЭ. На данном этапе РЭ приобретают t-SNARE белки (группу белков, принимающих участие в слиянии мембран), позволяющие получать транспортные везикулы от цистерн Гольджи, содержащие материал для формирования ПЭ и МВТ (возможно, уже и вакуолярные компоненты). Слияние РЭ между собой происходит с помощью CORVET — заякоривающего белкового комплекса. Формируется более крупный, нежели РЭ, мембранный компартмент — ПЭ. PtdIns(3)P служит сигналом для присоединения к РЭ и ПЭ крупных белковых комплексов ESCRT. Данные комплексы (их 4 типа) регулируют инвагинацию и почкование внутренних везикул МВТ и занимаются перераспределением груза в этих везикулах. Таким образом, МВТ являются частным случаем ПЭ, ПЭ становятся МВТ после ограниченной инвагинации эндосомальной мембраны и формирования внутренних везикул.

ПЭ/МВТ дрожжей могут быть расположены в цитоплазме около ядра, вакуолей, липидных включений и т.д. ПЭ/МВТ маркированы Rab7 и PtdIns(3, 5)P_2. Они, как и РЭ, получают транспортируемые грузы от цистерн Гольджи.

В дальнейшем МВТ могут преобразовываться в превакуолярные компартменты. Заключительный этап эндоцитоза — слияние МВТ или превакуолярных компартментов с вакуолями или вакуолями-лизосомами. Заякоривающую функцию здесь выполняет уже не комплекс CORVET, а комплекс HOPS, который также отвечает за слияние вакуолей и перераспределение вакуолярных белков.

6.4. Вакуоли

Вакуоль — окруженная однослойной мембраной или *тонопластом* органелла клетки эукариот и некоторых прокариот, содержимое которой представляет собой водный раствор неорганических (за исключением комплекса полифосфатов с белками и неорганическими ионами) и органических молекул, включая ферменты, и выполняющая разнообразные функции (запасание, транспорт, автолиз макромолекул и клеточных компонентов и др.). Вакуоли — это фактически крупная везикула, которая образуется путем слияния множества мелких везикул.

6.4.1. Морфология вакуолей

Вакуоли грибов разнообразны по морфологии (рис. 64). В клетках дрожжей *S cerevisiae* (рис. 64а) и *Dipodascus magnusii* (рис. 65) присутствуют разные по размеру (мелкие 1–2 мкм и крупные 6–8 мкм) и форме (сферические, овальные) вакуоли, что определяется динамикой процессов слияния и деления вакуоли на протяжении клеточного цикла и условий окружающей среды. На примере нескольких видов дрожжей (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) было показано, что слияние и деление вакуолей дрожжей находится под контролем ряда белков: родственного динамину белка Vps1p (динамины — ГТФазые белки, участвующие в отделении везикулы от родительской мембраны: плазмалеммы, ЭР и др.), фосфорилирования и дефосфорилирования белка Atg18 (из семейства *проппинов*, участвующих в автофагии) Делеция гена *VPS1* приводит к появлению крупных вакуолей, которые утратили способность к фрагментации даже в гипертонической среде. В гипертонических условиях культивирования *S. cerevisiae* потеря клеткой воды приводит к тому, что крупная вакуоль делится на множество мелких вакуолей с целью приведения в соответствие отношения поверхности вакуоли к объему.

Мутанты по Vps (vacuole protein sorting) имеют нарушения в сортинге белка, транспорте самих вакуолей, слиянии гомотипичных мембран и наследовании. Транспорт маленьких вакуолей в почку у *S. cerevisiae* осуществляется через актин и Myo2-зависимую транспортную систему.

Мицелиальные грибы также как и дрожжи имеют многочисленные мелкие вакуоли, характерные для апикальных клеток, и крупные вакуоли в удаленных от кончика клетках (рис. 64c–e). Характерной чертой вакуолей мицелиальных грибов, которая отличает их от вакуолей одноклеточных грибов являеется их высокий плейоморфизм и подвижность.

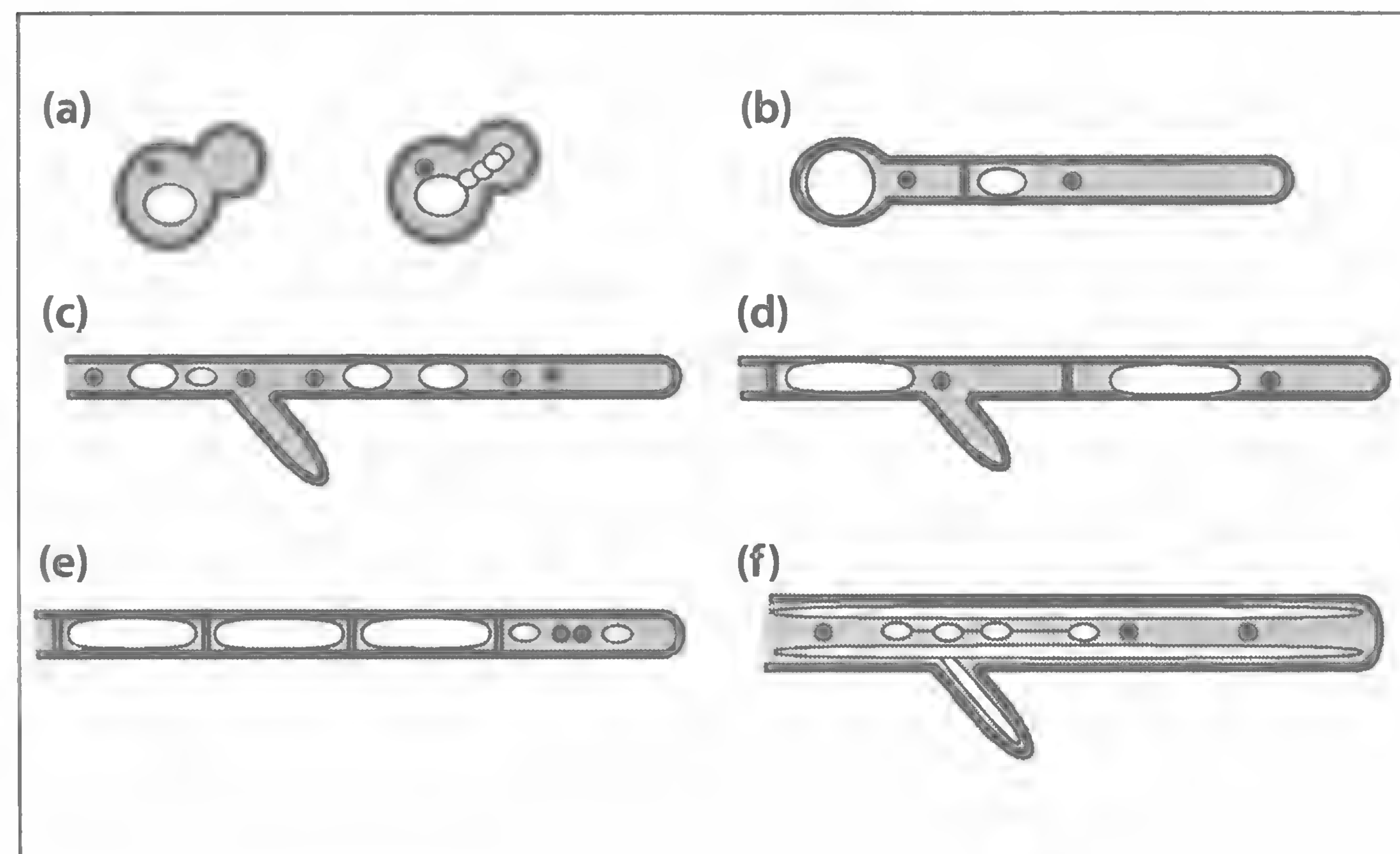


Рис. 64. Морфология и распределение вакуолей.
(a) *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжевая стадия *Candida albicans*, (b) гифы *C. albicans*, (c) аскомицеты с мицелиальной организацией таллома, (d) зигомицет *Basidiobolus ranarum*, (e) патоген растений базидиомицет *Ustilago maydis* и (f) трубчатая вакуолярная система, характерная для базидиомицетов *Phanerochaete, Pisolithus* и многих других грибов. Обозначения: вакуоли — белым цветом, ядра — черным цветом (Veses et al., 2008).

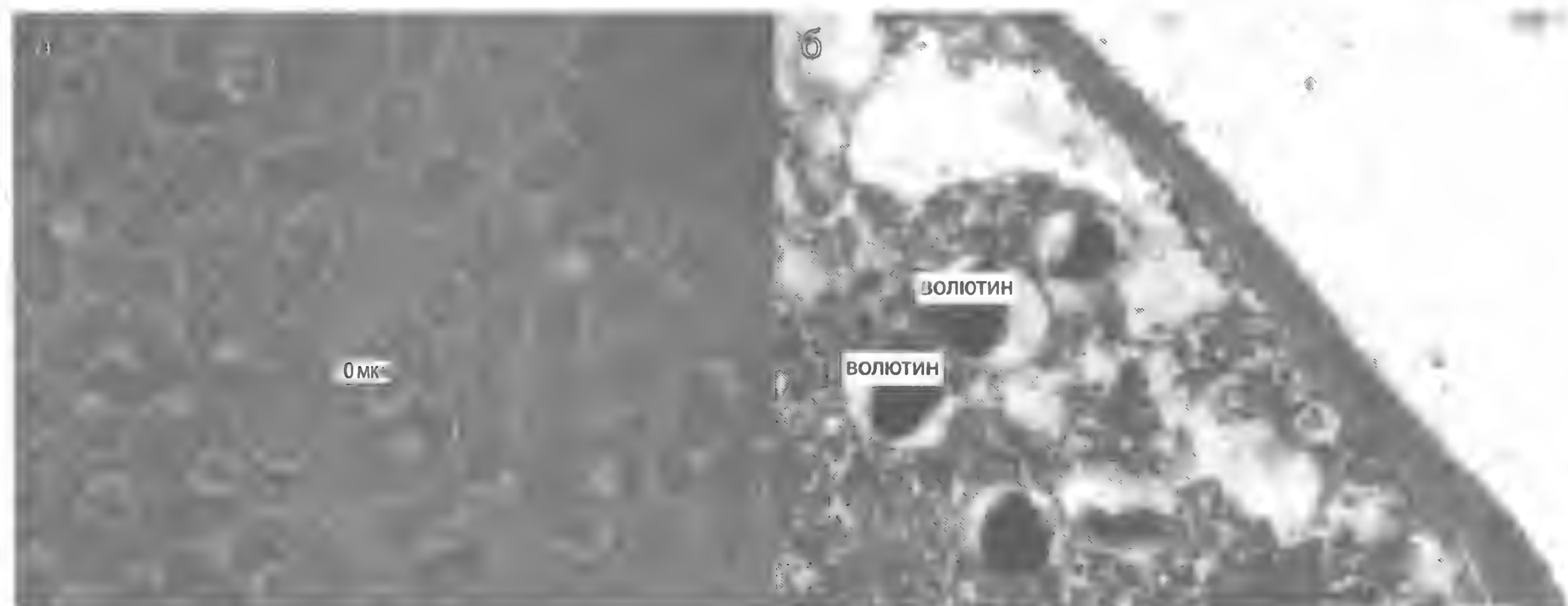


Рис. 65. Вакуоли с полифосфат-содержащими включениями (волютин) в клетках грибов.
а Внутри вакуолей дрожжей *Dipodascus magnusii* локализованы гранулы волютина (подробнее см. текст). Прижизненное окрашивание нейтральным красным.
б. Вакуоли с включениями волютина у *Agaricus bisporus* (ТЭМ). Масштабный отрезок 300 нм.

Подвижность этих вакуолей связана с ростом кончика гифы и их перистальтикоподобным движением (расширение-сокращение). Для вакуолярной системы грибов и псевдогрибов характерна подвижная трубчатая вакуолярная система. В большей степени она развита у грибов, образующих микоризу (рис. 64f). Морфология и движение трубчатой системы вакуолей зависит от микротрубочек.

Степень вакуолизации клеток грибов зависит от многих факторов, среди них положение клеток в колонии, осмотические свойства среды, эколого-трофические особенности и некоторые другие. Так, например, высокая вакуолизированность клеток грибов характерна для удаленных (дистальных) от растущей зоны частей колонии.

В вакуолях грибов накапливаются полифосфат-содержащие гранулы (волютин), окрашиваемые витальным красителем (нейтральный красный) (рис. 65а). На ультратонких срезах профили вакуолей гифы обычно наполнены гранулярным содержимым. Образцы мицелиальных грибов, подготовленных методом замораживания-замещения (freeze-substitution), обычно обнаруживают в вакуолях дисперсный материал с редко встречающимися включениями, окруженными однослойной мембраной, а при химической фиксации (глютаровый альдегид-осмий) в вакуолях встречаются скопления электронно-плотного материала полифосфатной природы (рис. 65б).

Апикальные клетки эктомикоризного гриба *Pisolithus tinctorius* и быстрорастущего сапротрофного базидиомицета *Phanerochaete velutina* относительно длинные и можно выделить несколько зон в зависимости от морфологии вакуолей, их подвижности и распространения. Самый кончик чаще всего имеет трубчатые вакуоли, связанные с маленькими эллипсоидными или сферическими вакуолями, а на некотором расстоянии от кончика расположена серия крупных и менее мобильных вакуолей, которые образуют контакты с трубчатыми вакуолями на кончике клетки (рис. 66А). Вакуолярная система с множеством трубчатых элементов часто наблюдается в трех первых от кончика клетках гифы растущей колонии (рис. 66В). С удалением от кончика гифы вакуоли становятся крупнее и менее подвижными. Трубчатая вакуолярная система была продемонстрирована также у грибов арбускулярной микоризы: *Gigaspora margarita* и *Glomus intraradices*. У этих двух грибов трубчатые вакуоли организованы в длинные параллельные пучки (рис. 66С), которые обра-

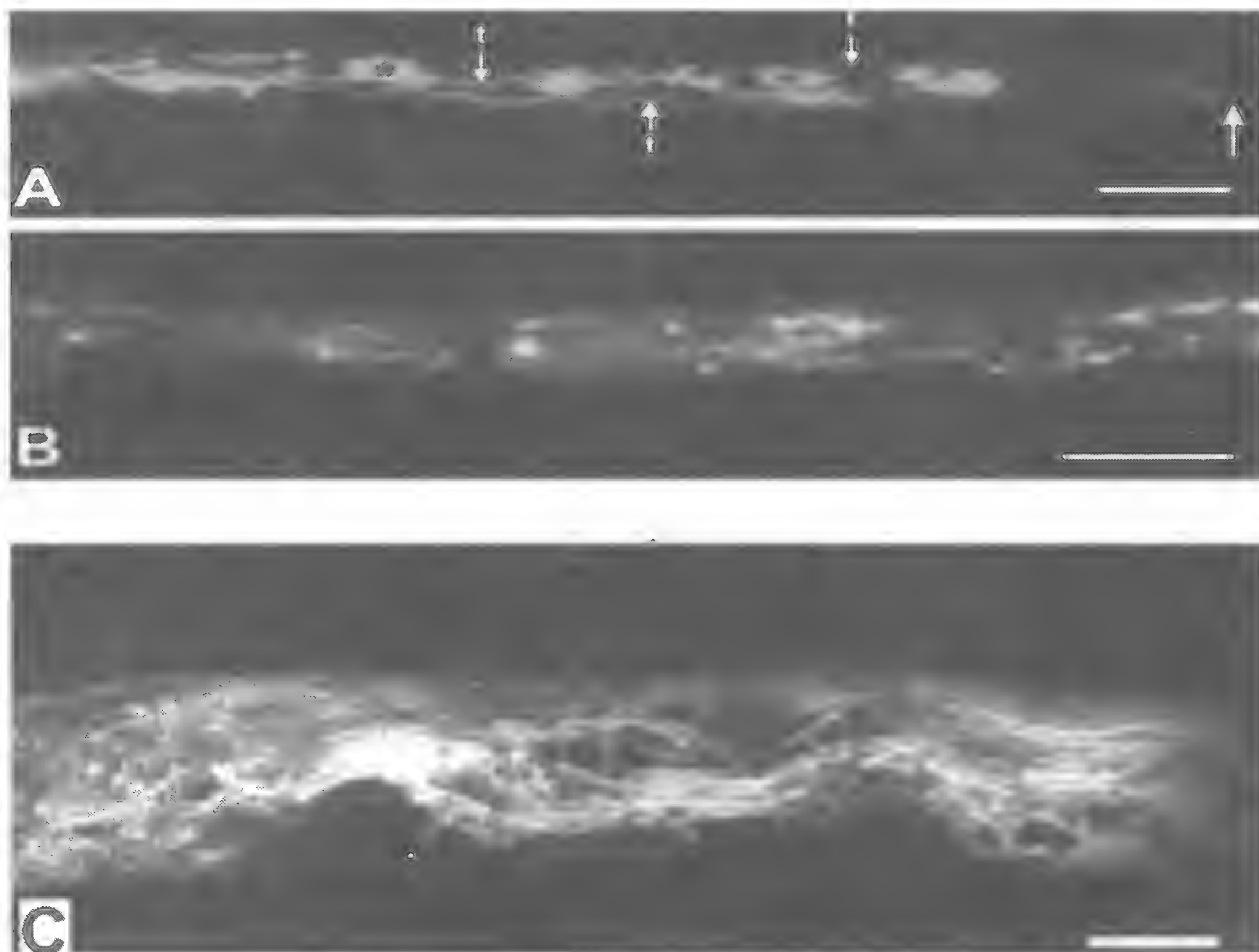


Рис. 66. Системы вакуолей у микоризных грибов.
Распределение флуоресцентного красителя в вакуолярной системе гиф эктомикоризного гриба *Pisolithus tinctorius.* Краситель: Oregon green carboxylic acid diacetate (DFFDA) (A и B).
(A) Кончик гиф содержит кластеры взаимосвязанных трубчатых вакуолей (t) с расширениями (звездочки). Заметно, что трубочки распространяются в район кончика (большая стрелка). Масштабный отрезок 10 мкм
(B) Субапикальная клетка также показывает трубчатую сеть вакуолей. Масштабный отрезок 10 мкм.
(C) Трубчатые вакуоли в ростковой трубке арбускулярно-микоризного гриба *Gigaspora margarita* при витальном окрашивании DFFDA с использованием конфокальной микроскопии. Трубчатые вакуоли отличаются от типичной системы вакуолей у базидиомицетов тем, что они часто лежат параллельными пучками, занимают большой объем протопласта и редко связаны со сферическими вакуолями. Масштабный отрезок 5 мкм (Ashford, Allaway, 2007).

зуют протяженные сети и встречаются как у гиф, находящихся внутри клеток растительного партнера симбиоза, так и у растущих в почве гиф и в ростковых трубках.

Трубчатые вакуоли обнаружены также у сапротрофов *A. oryzae* и *N. crassa*. Исследование движения белка t-SNARE Aovam3, маркированного зеленым флуоресцирующим белком (GFP), у *A. oryzae* продемонстрировало обилие трубчатых вакуолей в гифах, которые не находятся в прямом контакте с субстратом роста, что указывает на участие трубчатых вакуолей в транспорте питательных веществ через разные зоны мицелия. Исследование внутриклеточного передвижения хитинсинтазы у *N. crassa* показало, что две хитинсинтазы Chs3 и Chs6 накапливались в люмене сети трубчатых и глобулярных вакуолярных компартментов в дистальных районах гифы гриба перед доставкой к Spitzenkörper в апекс гифы. Таким образом, вакуолярная система является альтернативной дорогой для цитоплазматического транспорта белков, которые доставляются к поверхности клетки.

6.4.2. Наследование вакуолей

Наследование вакуолей у *S. cerevisiae* упорядоченно в пространстве и времени и согласовано с клеточным циклом. Материнская вакуоль ориентирована в направлении наметившейся почки в начале клеточного цикла, образуя делящуюся структуру, которая распространяется в зарождающуюся почку. Эта везикулярная структура сохраняется на протяжении 20% клеточного цикла, обеспечивая прохождение вакуолярного материала между материнской и дочерней клетками. В результате слияния мелких вакуолей в дочерней клетке формируется новая вакуоль (рис. 67). Поляризация клетки, зависимая от клеточного цикла, и последовательное направленное движение вакуолярного материала регулируются актиновым цитоскелетом и приводятся в действие миозином Myo2p, принадлежащим к классу нетрадиционных вакуолярных белков.

У мицелиальных грибов все доказательства указывают на участие микротрубочек в наследовании вакуолей (ингибиторы микротрубочек приводили к сокращению или исчезновению трубчатых вакуолей у *Pisolithus tinctorius*, а ингибиторы микрофиламентов нет; участие кинезина в формировании вакуолей у дикариотических гиф *U. maydis*; участие динеина в формировании субапикальных вакуолей у *N. crassa*).

Было показано, что цитокинез у *C. albicans* приводит к асимметричному наследованию вакуолей. Причем наследование вакуолей у диморфного патогенного гриба *C. albicans* адаптировано под разные морфологические формы. У дрожжевых клеток часть вакуоли материнской клетки перемещается в будущую почку. Ее фрагментация приводит к потоку везикул, которые проходят от материнской клетки к дочерней так, как это описано у *S. cerevisiae*. В ростковых трубках и псевдогифах наблюдается вытянутая структура делящейся вакуоли, при этом, в ростковых трубках происходит задержка между выпячиванием и формированием сегрегационной структуры. Это может указывать на то, что наследование вакуоли в ростковой трубке отделено от других событий клеточного цикла, таких как поляризация актина, которое у гифы *C. albicans* возникает перед стартом клеточного цикла. Компартменты гифы показывают разные примеры сегрегации и вакуолизации. В ростковых трубках первый клеточный цикл приводит к распределению в апикальной клетке большей части цитоплазмы и к дальнейшему прохождению клеточного цикла через стадию G_1 в следующий митотический цикл клетки, а в субапикальном компартменте наследуется большая вакуоль и происходит арест клеточного цикла в стадии G_1. В процессе растяжения апикальной клетки вакуолярный объем увеличивается в основном в дистальном районе

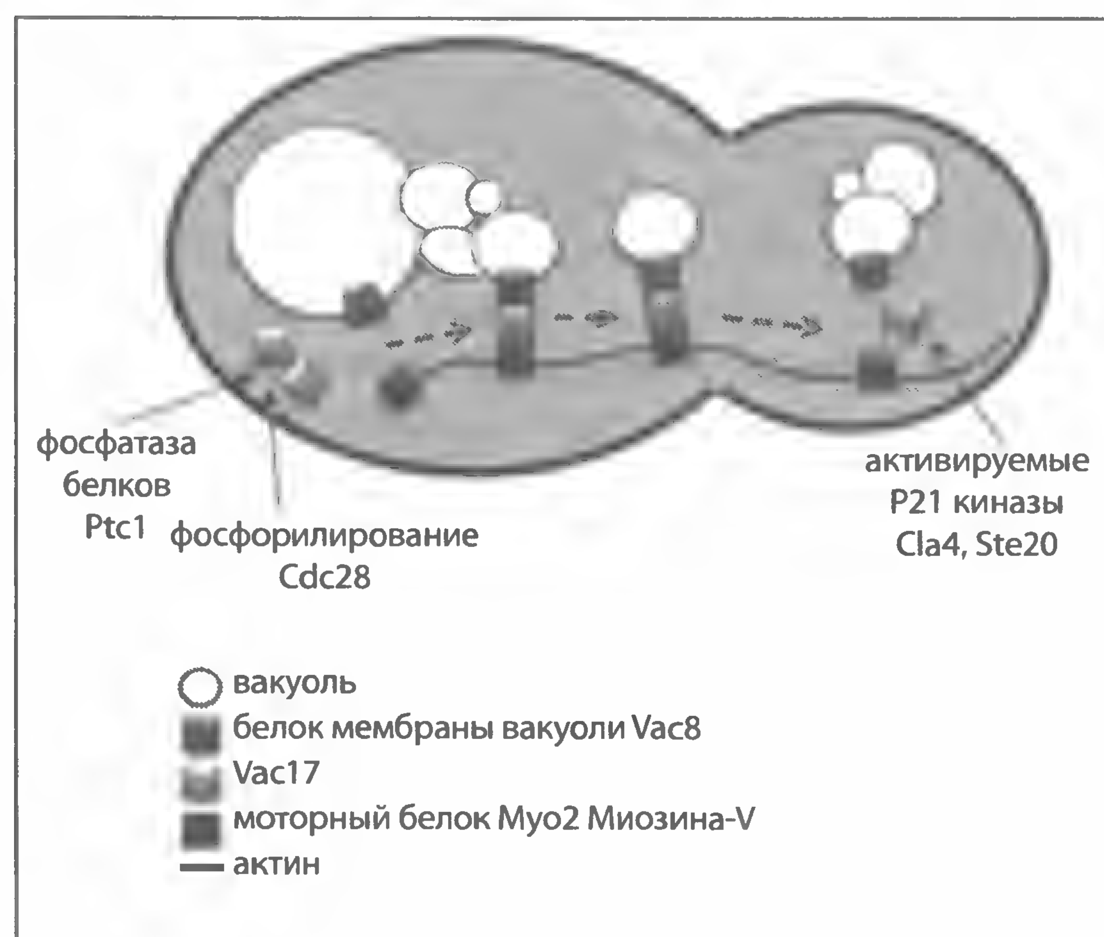


Рис. 67. Наследование вакуолей у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Комплекс Myo2eVac17eVac8 транспортирует вакуолярные везикулы в возникающую почку, где Vac17 деградирует и освобождает везикулы. Уровень Vac17 зависит от фосфорилирования циклин-зависимой киназой Cdc28, связанной с клеточным циклом. Фосфатаза Ptc1 необходима для поддержания стабильного уровня Vac17 и возможно для правильной ассоциации Myo2 с Vac17. p21 активируемые киназы Cla4 и Ste20 участвуют в удалении структур сегрегации и деградации Vac17 в почке (Richards et al., 2010).

клетки, и слияние вакуолей приводит к формированию крупной эллипсоидной вакуоли, которая часто захватывается субапикальной септой. Покадровая (цейтраферная) съемка *C. albicans* позволила наблюдать случаи, когда большие вакуоли в клетках гифы пересекались плоскостью развивающихся септ. Этот механизм деления вакуолей никогда не наблюдался у дрожжевых клеток и псевдогиф и представляет новый механизм деления (сегрегации) вакуолей в процессе деления клетки.

У *S. cerevisiae* большинство внутриклеточных органелл, включая вакуоль, перемещаются исключительно через актомиозин-зависимый механизм. У мицелиальных грибов вакуоли ассоциированы с микротрубочками, а положение вакуолей нарушается с утратой микротрубочек. У большинства эукариот движение на длинные дистанции происходит по микротрубочкам и строго координируется с актин-зависимым движением на короткие дистанции на периферии клетки. Исследования с использованием ингибиторов микротрубочек и микрофиламентов продемонстрировали особую роль актина в наследовании вакуолей у *C. albicans*. Цитохалазин А, специфический ингибитор актиновых филаментов, не действующий на кортикальные актиновые патчи или микротрубочки, блокировал движение и сегрегацию вакуолей. В его присутствии рост мицелия с поляризованного переключался на изотропный. В противоположность этому, нокодазол (ингибитор микротрубочек) не оказывал заметного действия на динамику вакуолей при нормальных концентрациях. При высоких концентрациях фрагментация вакуолей происходила аналогично механизму, описанному на митохондриях *S. cerevisiae*. Таким образом, показаны различия в динамике движения и архитектуре вакуолей у разных морфотипов *C. albicans* и возможность сегрегации крупной вакуоли в клетках гифы при септировании.

6.4.3. Функции вакуолей

Грибные вакуоли характеризуются широким спектром функций: осмо- и pH регуляция, поддержание ионного гомеостаза, запасание Ca^{2+}, неорганического фосфата и аминокислот, детоксикация цитоплазмы, транспорт питательных компонентов на длинные дистанции (транспортные вакуоли) и гидролиз биомолекул (вакуоли–лизосомы), участие в автофагии (автофагосомы).

6.4.3.1. Клеточный гомеостаз

Обеспечение многих функций вакуолей (таких как транспорт, запасание и поддержание гомеостаза) возможно благодаря активности вакуолярных H^+-АТФаз, которые закачивают H^+ в вакуоли, поддерживая внутри вакуолей кислое значение pH и генерируя мембранный потенциал 25–40 мВ (у *N. crassa*). У *S. cerevisiae* существуют 7 различных H^+/аминокислота антипортеров, транспортирующих в вакуоли аргинин, аргинин-лизин, гистидин, фенилаланин-триптофан, тирозин, глутамин-аспарагин и изолейцин-лейцин. Повышение концентрации многих ионов внутри вакуолей также обеспечивается благодаря работе протонного антипортера. Так, в вакуолях накапливаются такие ключевые ионы, как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}, тогда как K^+ и Na^+ присутствуют обычно в низких концентрациях. В вакуолях могут накапливаться и потенциально токсичные ионы, такие как Cd^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+} и Cu^{2+}.

Вакуоль представляет собой основное место в клетке, где запасается фосфат и полифосфат. Последний встречается в виде линейной молекулы из десятка или многих сотен остатков ортофосфорной кислоты. При насыщении фосфатом полифосфаты могут формировать видимые гранулы, которые совершают броуновское движение в вакуоли и окрашиваются прижизненно в красный цвет нейтральным красным. Полифосфаты образуют комплексы со многими ионами металлов, в том числе и кальция. Гидролиз полифосфатов приводит к освобождению протонов, что может указывать на возможную роль полифосфатов в регуляции pH.

6.4.3.2. Гидролитический компартмент

Биохимически вакуоль характеризуется присутствием α-маннозидазы, локализованной в вакуолярной мембране. Вакуолярное содержимое и мембранно-ассоциированные белки, которые включают протеиназы, аминопептидазы, α-маннозидазу и щелочную фосфатазу, транспортируются через секреторный путь, проходящий от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи, и затем, ответвляясь от секреторного пути, участвуют в вакуолярном сортинге белков (рис. 57). Материал, деградирующий в вакуолях, может поступать как из эндоцитозного пути, так и при автофагии, когда необходимо расщепить массу клеточного материала, например, в ответ на стресс или голодание.

6.4.3.3. Транспорт питательных веществ на длинные дистанции

Подвижная трубчатая вакуолярная система у микоризообразующих и сапротрофных мицелиальных грибов, по-видимому, вовлечена в транспорт питательных веществ на длинные расстояния по гифе. У эктомикоризного гриба *P. tinctorius* наблюдается транспорт питательных веществ между растением и кончиками гиф гриба. Обнаружено, что благодаря системе взаимосвязанных вакуолей у ксилотрофного гриба *Phanerochaete velutina* происходит распространение питательных веществ (азот- и фосфат-содержащих) при перистальтикоподобном движении вакуолей. У везикулярно-арбускулярного микоризного гриба *Gigaspora margarita* было показано, что трубчатые вакуоли не следуют тем же путем, что и основная масса цитоплазмы. Полагают, что комбинация тока цитоплазмы плюс транспорт трубчатых вакуолей более эффективны в распределении питательных веществ у гриба. У немикоризного гриба *Aspergillus oryzae* показано участие трубчатых вакуолей в транспорте питательных веществ через разные участки мицелия, в том числе и не контактирующие с питательным субстратом.

Последние исследования вакуолей продемонстрировали, что они играют центральную роль в росте и дифференциации грибов, а также в некоторых других аспектах клеточной физиологии.

Биогенез вакуолей энергетически менее затратный процесс, чем синтез новой цитоплазмы, поэтому гифа, заполненная вакуолями, становится важным аспектом питания в экологии многих видов грибов. В процессе развития инфекции кукурузы при заражении базидиомицетом *U. maydis* требуется слияние двух гаплоидных споридий разных типов спаривания для формирования мицелиальной дикариотической гифы. На этой патогенной стадии развития гриб способен проникать в ткани меристемы и вызывать разрастание меристематической ткани кукурузы. Рост дикариотической гифы в клетках меристематической ткани включает поляризованный рост гифы путем растяжения вакуолизированных септированных клеток с неделящимися ядрами.

У фитопатогенного гриба *Magnaporthe grisea* прорастающие споры образуют поляризованную ростковую трубку, которая дифференцируется на кончике для формирования аппрессория. Аппрессорий *M. grisea* генерирует тургорное давление до 8 MPa для создания силы, достаточной для разрыва кутикулы клетки риса. Вакуоль подвергается интенсивному растяжению для поддержания развития аппрессория и, благодаря деградации липидных запасов, генерирует осмотически активные метаболиты. Этот процесс увеличивает тургорное давление созревающего аппрессория для содействия внутренним силам внедрения гриба в эпидермис растения. Вторая функция вакуолей при формировании и развитии аппрессория — это вклад в аутофагическую смерть клетки, которая ассоциирована с дегенерацией ядер и коллапсом конидии. Формирование аппрессория — это составная часть программы развития, включающей миграцию и деление ядер, и далее гибель родительской конидии. Мутант tg8D *M. grisea,* у которого ослаблена аутофагическая смерть конидии, был не патогенным.

Мутации, влияющие на функции, биогенез и наследование вакуолей часто приводят к дефектам вирулентности. У *C. albicans* такие мутации приводили к дефектам виру-

лентности при системной инфекции модельных мышей или при поглощении макрофагами *in vitro*. В большинстве случаев мутанты *C. albicans*, дефектные по морфологии вакуолей, были дефектны в формировании гифы. Штамм, несущий дефектную аллель VPS11 и имеющий фрагментированные вакуоли, не был вирулентен. Нулевой мутант vps11D, не имеющий вакуолярных компартментов, был чувствителен к стрессу, имел редуцированную протеолитическую активность, дефекты в образовании мицелия и быстро поглощался макрофагами.

6.4.4. Автофагия и автофагосомы

Некоторые грибы могут расти и осваивать окружающую среду обитания при высоко *олиготрофных* условиях. Например, некоторые патогенные для растений и животных грибы занимают ниши, бедные по питательным компонентам, такие как поверхности листьев и кожи; они способны к росту на поверхности перед тем, как внедриться в хозяина. Виды родов *Magnaporthe*, *Puccinia*, *Ustilago* и *C. albicans* могут расти при ограниченном питании путем рециклизации своих внутренних питательных веществ и минимизации биосинтетических расходов с увеличением объема цитоплазмы путем формирования интенсивно вакуолизированных гиф и автофагии.

Автофагия (от греч. αὐτός — сам и φαγεῖν — «есть») — это процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь вакуолей (автофагосом) и подвергаются в них деградации. Автофагия — это высококонсервативный катаболический процесс у эукариотических организмов, который отвечает за оборот органелл, переработку мембран и деградацию белков в вакуолях/лизосомах. Автофагия индуцируется в ответ на окружающий стресс или сигналы развития в процессе клеточной дифференциации. Автофагия может действовать как механизм выживания или участвовать в программируемой клеточной смерти в зависимости от физиологических условий. Автофагия играет решающее значение в дифференциации ряда грибов, таких как *Podospora*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Magnaporthe*.

Автофагия запускается, когда требуется массивная неспецифическая деградация цитоплазматического материала для утилизации клеточных питательных веществ, вносящая вклад в выживание гриба в периоды дефицита питания. Например, у *M. grisea* индукция образования и роста аппрессория при голодании связана с формированием вакуоли и автофагией конидии, также как и псевдомицелиальный рост у *S. cerevisiae*. Эти исследования позволили предположить, что автофагия может быть важным механизмом выживания грибов и прохождения дифференциации при недостатке питательных веществ.

Эукариоты имеют два главных пути деградации белков и органелл, а именно: через протеосомы, которые играют важную роль в деградации ненужных и поврежденных белков цитоплазмы и ядра, и через вакуоли. В свою очередь, путь, который обеспечивает вакуоли дрожжей материалом для деградации — это автофагия. Этот путь включает несколько клеточных процессов деградации: макроавтофагию, микроавтофагию, пексофагию и шаперонопосредуемую автофагию (рис. 68). Все они сходятся на вакуоли. *Макроавтофагия* является наиболее исследованным путем и поэтому часто ее называют автофагией. Это процесс неселективной деградации, при помощи которого в эукариотических клетках деградирует материал цитоплазмы и органелл. Процесс имеет особое значение для клеточных организмов при истощении питательных веществ. В процессе макроавтофагии у *S. cerevisiae* двойная мембрана окружает порцию цитоплазмы. Это приводит к формированию *аутофагосомы* (рис. 68). Позднее наружный слой аутофагосомы сливается с мембраной вакуоли. В заключении одномембранная структура в вакуолярном люмене или аутофагическое тело деградирует под действием вакуолярных гидролаз для пополнения питательных запасов.

Микроавтофагия включает прямую инвагинацию материала цитозоля в вакуоль. Селективный процесс, являющийся основополагающим для сортинга основных резидент-

ных гидролаз, находящихся в зимогенной форме, в вакуоли, был обозначен как Cvt-путь (**c**ytoplasm **t**o **v**acuole **t**argeting) и не так давно описан для *S. cerevisiae.* В процессе Cvt-пути формируются ферменты аминопептидаза 1 (Ape1) и α-маннозидаза (Ams1), которые встраиваются в двухмембранную структуру Cvt-везикулы (рис. 68). Как и в случае макроавтофагии, двухмембранная везикула сливается с вакуолью и приводит к формированию одномембранного Cvt-тела в вакуолярном люмене. После лизиса гидролазами вакуолей зимогены Cvt-пути созревают и активируются.

Пексофагия — это путь деградации целевых пероксисом. Когда метаболические пути, связанные с пероксисомами, становятся ненужными для роста клеток, органеллы деградируют (см. также главу «Пероксисомы»). Также деградируют и митохондрии (см. также главу «Митохондрии»).

Дополнительный автофагический процесс происходит при участии молекул *шаперона*, который связан с цитоплазматическими белками, подлежащими деградации.

Хотя макро- и микроавтофагия морфологически различаются, исследования на *S. cerevisiae* подтвердили, что они могут регулироваться одной и той же молекулярной машиной. У мицелиальных грибов автофагия обычно связана с расширением вакуоли. Автофагия хорошо изучена у *S. cerevisiae* и в клетках животных, так как участвует во многих биологических процессах, в том числе старении и болезнях человека, включая опухоли, нейродегенерацию и микробную инфекцию. К настоящему времени у *S. cerevisiae* идентифицирован 31 ген, связанные с автофагией (*ATG*, autophagy-related genes). Из них 18 кодируют продукты генов, составляющих основу автофагической машины, и могут быть разделены на три главные группы: (i) ATG9 и его окружение (*ATG1, ATG13, ATG2 и ATG18*); (ii) фосфатидилинозитол 3-киназный комплекс (*VPS34, VPS15, VPS30/ATG6 и ATG14*) и (iii) убиквитиноподобная белковая система (*ATG8, ATG12, ATG7, ATG10, ATG3, ATG4, ATG5 и ATG16*). ATG9 является интегральным мембранным белком, который имеется у разных видов грибов. Делеция *ATG9* у *S. cerevisiae* и *C. albicans* блокирует автофагию, однако atg9D мутанты имеют разные фенотипы в клеточном развитии, варьирующие между видами. У *S. cerevisiae* мутант atg9D дефектен в споруляции, в то время как у *C. albicans* делеция *ATG9* не оказывает заметного влияния ни на дрожжевую, ни на мицелиальную стадии. Делеция *ATG8* является причиной блокировки автофагии как у *M. grisea,* так и у *A. oryzae*, но эти мутанты также имеют разные фенотипы в развитии клетки. У мутанта atg8D гриба-патогена риса процесс формирования аппрессория не полный и гриб не патогенен, в то время как мутация atg8D у *A. oryzae* предотвращает формирование конидий и воздушного мицелия. Таким образом, автофагия выполняет разнообразные специфичные для организма роли в процессе дифференциации грибов.

Таким образом, эндомембранная система грибов имеет несколько своеобразных структурных черт, которые помещают ее отдельно от других высших эукариот. Например, аппарат Гольджи у грибов не имеет стопок мембранных цистерн (диктиосом) и не передается при делении клеток. У мицелиальных грибов не показано присутствие матриксных белков гольджинов и нет доказательства существования «одетых» в клатрин везикул, которые участвуют в эндоцитозе у животных.

Литература

Камзолкина О.В., Мажейка И.С., Штаер О.В., Кудрявцева О.А., Мухин В.А. 2014. Эндомембранная система у грибов: классическое и современное представление // Цитология. Т.56. С.549–561.

Ashford A.E., Allaway W.G. 2007. [Motile tubular vacuole systems] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition. The Mycota VIII. Berlin. Heidelberg:. Springer-Verlag. P.49–86.

Barelle C.J., Bohula E.A., Kron S.J., Wessels D., Soll D.R., Schafer A., Brown A.J.P., Gow N.A.R. 2003. Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans* // Eukaryotic Cell. Vol.2. No.3. P.398–410.

Behnia R, Munro S. 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic // Nature. Vol.438. No.7068. P.597–604.

Berepiki A., Lichius A., Read N.D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi // Nature Reviews Microbiology. Vol.9. P.876–887.

Bone N, Millar J.B.A., Toda T., Armstrong J. 1998. Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases // Current Biology. Vol.8. No.3. P.135–144.

Bourett T.M., James S.W., Howard R.J. 2007. [The endomembrane system of the fungal cell. 1] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition. The Mycota VIII. Berlin. Heidelberg:.Springer-Verlag.. P.1–47.

Bryant N.J., Stevens T.H. 1998. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole // Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol.62. No.1. P.230–247.

Casadevall A, Nosanchuk J.D., Williamson P., Rodrigues M.L. 2009. Vesicular transport across the fungal cell wall // Trends in Microbiology. Vol.17. No.4. P.158–162.

Cole L., Orlovich D.A., Ashford A.E. 1998. Structure, function and motility of vacuoles in filamentous fungi // Fungal Genetics and Biology. Vol.24. P.86–100.

Darrah P.R., Tlalka M., Ashford A., Watkinson S.C., Fricker M.D. 2006. The vacuole system is a significant intracellular pathway for longitudinal solute transport in Basidiomycete Fungi // Eukaryotic Cell. Vol.5. No.7. P.1111–1125.

Efe J.A. 2007. [Vacuole biogenesis, function, and size control in *Saccharomyces cerevisiae*: central roles for membrane trafficking and lipid signaling] // [Dissertation .of Doctor of Phylosophy in Biology.]. USA. University of California. San Diego. P.1–200. https://escholarship.org/uc/item/1tv6g2f1#page-7.

Higuchi Y., Nakahama T., Shoji J., Arioka M., Kitamoto K. 2006. Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein // Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol.340. P.784–791.

Hubbard M.A., Kaminskyj S.G.W. 2008. Rapid tip-directed movement of Golgi equivalents in growing *Aspergillus nidulans* hyphae suggests a mechanism for delivery of growth-related materials // Microbiology. Vol.154. P.1544–1553.

Kane P.M: 2006. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H+-ATPase // Microbiol Mol Biol Rev. Vol.70. P.177–191.

Kanki T, Klionsky D.J., Okamoto K. 2011. Mitochondria autophagy in yeast // Antioxidants& Redox Signaling. Vol.14. No.10. P.1989–2001.

Klionsky D.J., Herman P.K., Emr S.D. 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis // Microbiol Rev. Vol.54. P.266–292.

Losev E, Reinke C.A., Jellen J, Strongin D.E., Bevis B.J., Glick B.S. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast // Nature. Letters. Vol.441. No.22. P.1002–1006.

Maruyama J., Kitamoto K. 2007. Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi. Minireview // FEMS Microbiol Lett. Vol.272. P.1–7.

Meijer W.H., van der Klei I.J., Veenhuis M., Kiel J.A. 2007. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes // Autophagy. Vol.3. P.106–116.

Michaillat L., Mayer A. 2013. Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS ONE. Vol.8. No.2. P.1–12.

Nakano A. 2004. Yeast Golgi apparatus — dynamics and sorting // CMLS. Cell. Mol. Life Sci. Vol.61. P.186–191.

Oberwinkler F., Kirschner R., Arenal F.,Villarreal M., Rubio V., Begerow D., Bauer R. 2006. Two new pycnidial members of the Atractiellales: *Basidiopycnis hyalina* and *Proceropycnis pinicola* // Mycologia. Vol.98. No.4. P.637–649.

Peñalva M.A. 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64 // Fungal Genetics and Biology. Vol.42. P.963–975.

Pereira-Leal J.B. 2008. The Ypt/Rab family and the evolution of trafficking in fungi // Traffic. Vol.9. P.27–38.

Pollack J.K., Harris S.D., Marten M.R. 2009. Autophagy in filamentous fungi // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. P.1–8.

Prescianotto-Baschong C., Riezman H. 1998. Morphology of the yeast endocytic pathway // Molecular Biology of the Cell. Vol.9. P.173–189.

Rees B., Shepherd V.A., Ashford A.E. 1994. Presence of a motile tubular vacuole system in different phyla of fungi // Mycol Res. Vol.98. P.985–992.

Richards A., Veses V., Neil A.R. Gow N.A.R. 2010. Vacuole dynamics in fungi. Review .// Fungal Biology Reviews. Vol.24. P.93–105.

Rossanese O.W., Soderholm J., Bevis B.J., Sears I.B., O'Connor J., Williamson E.K., Glick B.S. 1999. Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae* // The Journal of Cell Biology. Vol.145. No.1. P.69–81.

Röthlisberger S., Jourdain I., Johnson C., Takegawa K., Hyams J.S. 2009. The dynamin-related protein Vps1 regulates vacuole fission, fusion and tubulation in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. P.927–935.

Shirahama K., Yazaki Y., Sakano K., Wada Y., Ohsumi Y. 1996. Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Plant Cell Physiol. Vol.37. No.8. P.1090-1093.

Shoji J., Arioka M., Kitamoto K. 2008. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production // Biotechnol Lett. Vol.30. P.7–14.

Shoji J-y, Arioka M., Kitamoto K. 2006. Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* // Eukaryotic Cell. Vol.5. No.2. P.411–421.

Smythe E., Ayscough K.R. 2003. The Ark1/Prk1 family of protein kinases regulators of endocytosis and the actin cytoskeleton // EMBO reports. Vol.4. No.3. P.246–251.

Steinberg G. 2007. On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity // Nat Rev Microbiol. Vol.5. P.309–316.

Veses V., Gow N.A.R. 2008. Vacuolar dynamics during themorphogenetic transition in *Candida albicans* // FEMS Yeast Res. Vol.8. No.8. P.1339–1348.

Veses V., Richards A., Gow N.A.R. 2008. Vacuoles and fungal biology // Current Opinion in Microbiology. Vol.11. P.503–510.

Veses V., Richards A., Gow N.A. R. 2009. Vacuole inheritance regulates cell size and branching frequency of *Candida albicans* hyphae // Molecular Microbiology. Vol.71. No.2. P.505–519.

Vida T.A., Emr S.D. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast .// J. Cell Biol. Vol.128. P.779–792.

Wedlich-Söldner R., Schulz I., Straube A., Steinberg G. 2002. Dynein supports motility of erndoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis* // Molecular Biology of the Cell. Vol.13. P.965–977.

Wedlich-Söldner R., Bölker M., Kahmann R., Steinberg G. 2000. A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* // EMBO J. Vol.19. P.1974–1986.

Zieger M., Mayer A. 2012. Yeast vacuoles fragment in an asymmetrical two-phase process with distinct protein requirements // Molecular Biology of the Cell. Vol.23. No.1. P.3438–3449.

Глава 7.
Пероксисомы грибов[1]

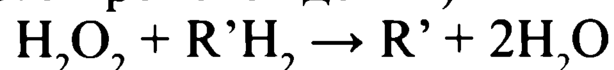
7.1. Общие сведения

Пероксисомы или микротельца — органеллы, окруженные однослойной мембраной. Пероксисомы присутствуют у большинства эукариотических организмов, имеют, как правило, округлую форму и небольшой размер (≤ 1 мкм), но могут быть значительно крупнее и формировать удлиненные или ветвящиеся структуры. Пероксисомы имеют только одну мембрану и не содержат ДНК и рибосом. Так как у них нет собственного генома, все их белки поставляются извне.

Пероксисомы содержат ферменты, ответственные за множество биохимических путей, в частности, β-окисление жирных кислот и метаболизм перекиси водорода. В матриксе пероксисом локализованы ферменты оксидоредуктазы, которые образуют перекись водорода (H_20_2) при участии молекулярного кислорода (отсюда их название), а также ферменты регуляции активных форм кислорода (АФК). Они выполняют несколько метаболических функций, которые варьируют не только между организмами, но и клетками одного организма. Пероксисомы чрезвычайно динамичные органеллы, подвергаются быстрой перестройке в клетке (размножению или автофагии) в зависимости от условий культивирования, фазы роста и т.д. и работают в тесной связи с другими органеллами (эндоплазматическим ретикулумом, митохондриями).

В большинстве случаев пероксисома содержит каталазу. Каталаза разлагает образовавшуюся перекись водорода, поскольку она достаточно токсична. В результате разложения перекиси водорода происходит окисление множества субстратов, например, фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида, спирта. Этот тип окислительных реакций особенно важен для детоксикации ксенобиотиков (токсичных органических соединений антропогенного происхождения):

$H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$



[1] Сокращения

АФК — активные формы кислорода

ПМБ — пероксисомальные матриксные белки

ТВ — тельца Воронина

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия.

ЦОМТ — центр организации микротрубочек

ЭР — эндоплазматический ретикулум

acetyl-CoA — ацетил коэнзим-А

AO — алкогольоксидаза

ATG — **a**u**t**ophagy-related **g**enes — гены, связанные с автофагией

CAT — каталаза

DHAS — дигидроксиацетон- синтаза

DRPs — динаминоподобные белки

Inp1 — **In**heritance of **p**eroxisomes protein **1** — белок, отвечающий за наследование пероксисом.

MIPA — микропексофагия-специфичный мембранный аппарат

PAS (англ. phagophore assembly site) — место сборки мембраны фагофора, окружающей будущую фагосому.

RING — Really Interesting New Gene — белковый структурный домен типа «цинкового пальца», который связывает два катиона цинка.

WSC — Woronin body sorting complex — белковый комплекс, участвующий в сортинге телец Воронина.

Пероксисомы участвуют в регуляции разнообразных процессов развития, таких как узнавание женских/мужских гаметофитов при оплодотворении цветковых растений, дифференциации и миграции нейронов в процессе развития мозга у животных. Более того, у растений пероксисомы снабжают клетки разными сигнальными молекулами. У людей пероксисомы необходимы для процессов развития, и их дефицит приводит к множеству аномалий, которые часто летальны. У грибов пероксисомы необходимы для утилизации необычных источников углерода и азота, биосинтеза вторичных метаболитов, созревания и прорастания спор, важны для хищных и патогенных грибов.

Пероксисомы присутствуют у большинства групп грибов. Исключение составляет группа анаэробных грибов, таких как Microsporidia, у которых также отсутствуют настоящие митохондрии. Нет доказательств их присутствия у грибов, обитающих в рубце жвачных животных, Neocallimastigales, а микротельце-подобные органеллы гидрогеносомы по последним данным образуются из митохондрий. По-видимому, у анаэробных грибов пероксисомы были вторично утрачены, на что указывает существование ортологов некоторых *pex* генов в геноме у микроспоридий.

7.2. Динамика пероксисом (биогенез и деградация)

7.2.1. Биогенез

Новые пероксисомы всегда возникают из предсуществующих и формируются путем роста и деления органеллы, т. е. размножаются подобно митохондриям и хлоропластам.

Детальные морфологические исследования динамики пероксисом проводили на различных видах метилотрофных дрожжей. Так, перенос растущих на глюкозе клеток *Hansenula polymorpha* на метанол-содержащую среду инициирует увеличение размера единичных маленьких пероксисом, благодаря включению новых синтезированных пероксисомальных белков и липидов мембран (рис. 69). Рост этих органелл прекращается, когда они достигают определенного зрелого размера. Тогда от пероксисомы отделяется одна или чаще несколько новых органелл, которые соответственно начинают расти.

Молекулярные основы биогенеза пероксисом достаточно хорошо изучены. Формирование пероксисом у разных эукариотических организмов характеризуется общей основой биогенетических процессов, происходящих при посредничестве большого числа консервативных белков, известных как пероксины (для которых была принята аббревиатура Pex).

Белки, контролирующие динамику пероксисом, классифицируются по их участию в трех основных процессах биогенеза пероксисом:

(1) биогенез пероксисомальных мембран,

(2) импорт пероксисомальных матриксных белков,

(3) пролиферация или деление пероксисом.

Сборка функционирующей пероксисомы требует импорта примерно 100 разных кодируемых ядром белков. Эти белки могут включаться в пероксисомальную мембрану или матрикс органеллы.

В настоящее время общепринято, что практически все пероксисомальные матриксные белки (ПМБ) синтезируются на свободных полисомах в цитозоле и посттрансляционно импортируются в предсуществующие органеллы. Имеются доказательства того, что часть ПМБ также поступает от ЭР (рис. 70).

Для мембранных белков ситуация более сложная; в зависимости от белка и изучаемого организма биосинтез этого класса молекул происходит на свободных или связанных с ЭР рибосомах. Сборка функционирующей пероксисомальной мембраны требует координированного синтеза и поглощения не только белков, но и липидов. На протяжении многих лет

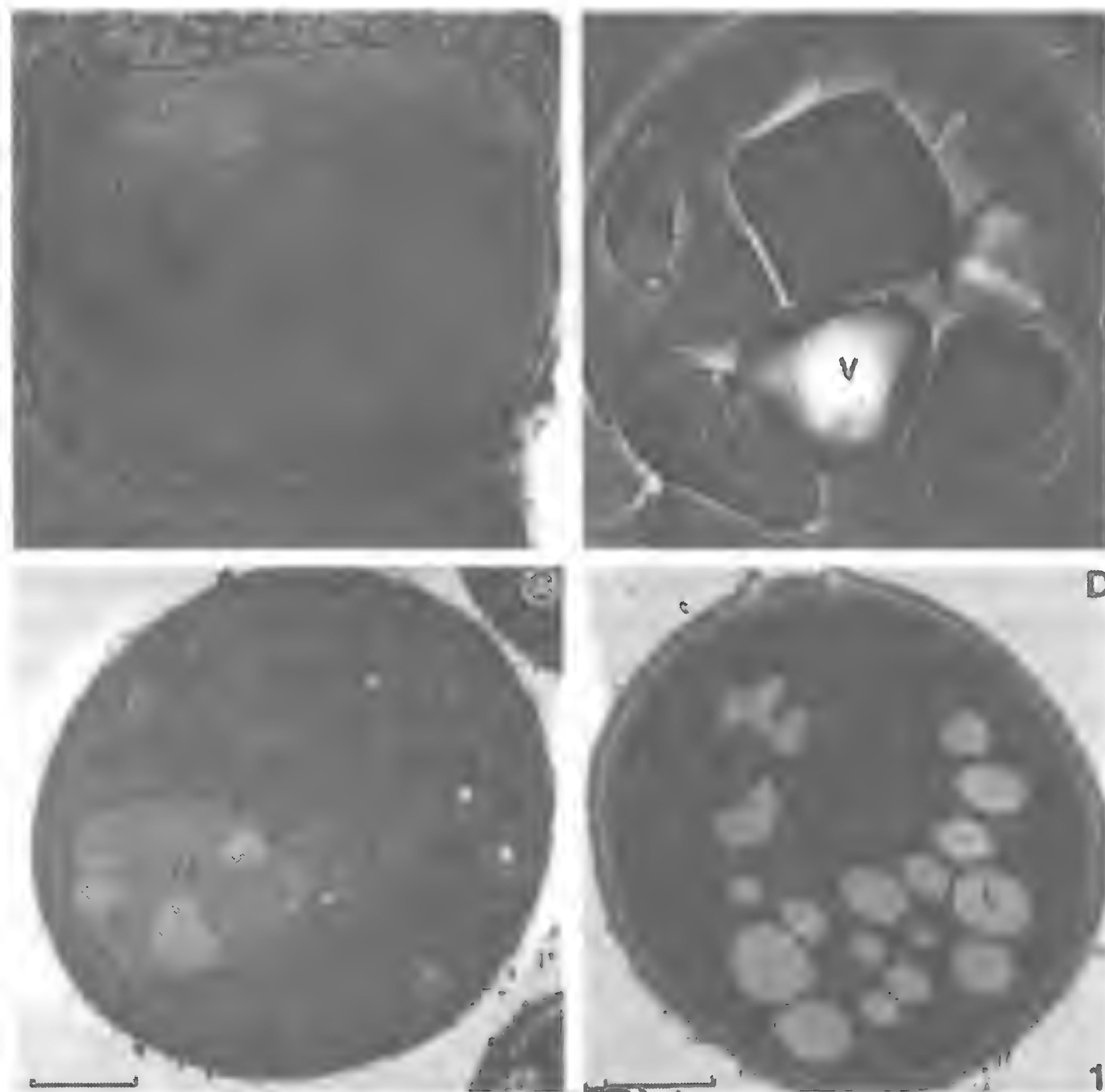


Рис. 69. Пролиферация пероксисом у дрожжей.
A. Кубоидные пероксисомы с кристаллическим матриксом, содержащим алкогольоксидазу у клеток *Hansenula polymorpha*, культивируемых на среде с метанолом (ТЭМ). Масштабный отрезок 0,1 мкм. B. Кубоидная форма органелл хорошо видна на репликах сколов замороженных клеток *H. polymorpha*. C. Пероксисомы в клетках *Trichosporon cutaneum.*, культивируемых на этиламине как единственном источнике углерода и азота. D. Пероксисомы в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, растущих на олеиновой кислоте. Масштабный отрезок 1 мкм. Обозначения: L — липидная капля; M — митохондия; N — ядро; P — пероксисома; V — вакуоль (Veenhuis et al., 2000).

были собраны доказательства участия ЭР в этом процессе сборки. Пероксисомы не способны синтезировать свою собственную фосфолипидную мембрану. В настоящее время показано, что фосфолипиды, требующиеся для растяжения пероксисомальной мембраны, могут поступать из ЭР везикулярным (например, у дрожжей *Pichia pastoris*) и невезикулярным (например, у животных) транспортным путем.

У грибов процесс биогенеза пероксисом подробно изучен у дрожжей (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *H. polymorpha*) и ряда мицелиальных грибов (*Podospora anserina*, *Magnaporthe grisea*).

В биогенезе и включении в мембрану пероксисомальных мембранных белков аскомицета *P. anserina* участвуют три пероксисомальных матриксных белка: Pex3, Pex16, Pex19.

В импорте пероксисомальных матриксных белков используется большой набор пероксинов: Pex1, Pex2, Pex4-Pex10, Pex12-Pex15, Pex17-Pex18, Pex20-Pex22, Pex26, отсутствие которых приводит к формированию пустых оболочек пероксисом. Пероксины Pex5 и Pex7 являются растворимыми рецепторами, узнающими матриксные белки в цитозоле (с помощью PTSl/ПТС1 или ПТС-2 маркерных последовательностей-мишеней, соответственно), в то время как стыковочный узел мембраны пероксисом обусловлен пероксинами Pexl4, Pexl3, а у дрожжей, Pexl7p (док-комплекс). Эти белки вместе с белками, содержащими домен связывания катионов цинка (RING — Really Interesting New Gene — finger domain-containing) Pex2, Pex10 и Pexl2, формируют более крупный комплекс, известный как импортомер; этот комплекс, возможно, являются транслокатором (переносчиком) для матриксных белков у *S. cerevisiae*. Пероксин Pex8p обеспечивает стыковку комплекса (RING finger complexes) импортомера с пероксисомой. Белки матрикса пероксисом переносятся вместе с рецепторами Pex5 или Pex7 и после освобождения груза в пероксисомальный мат-

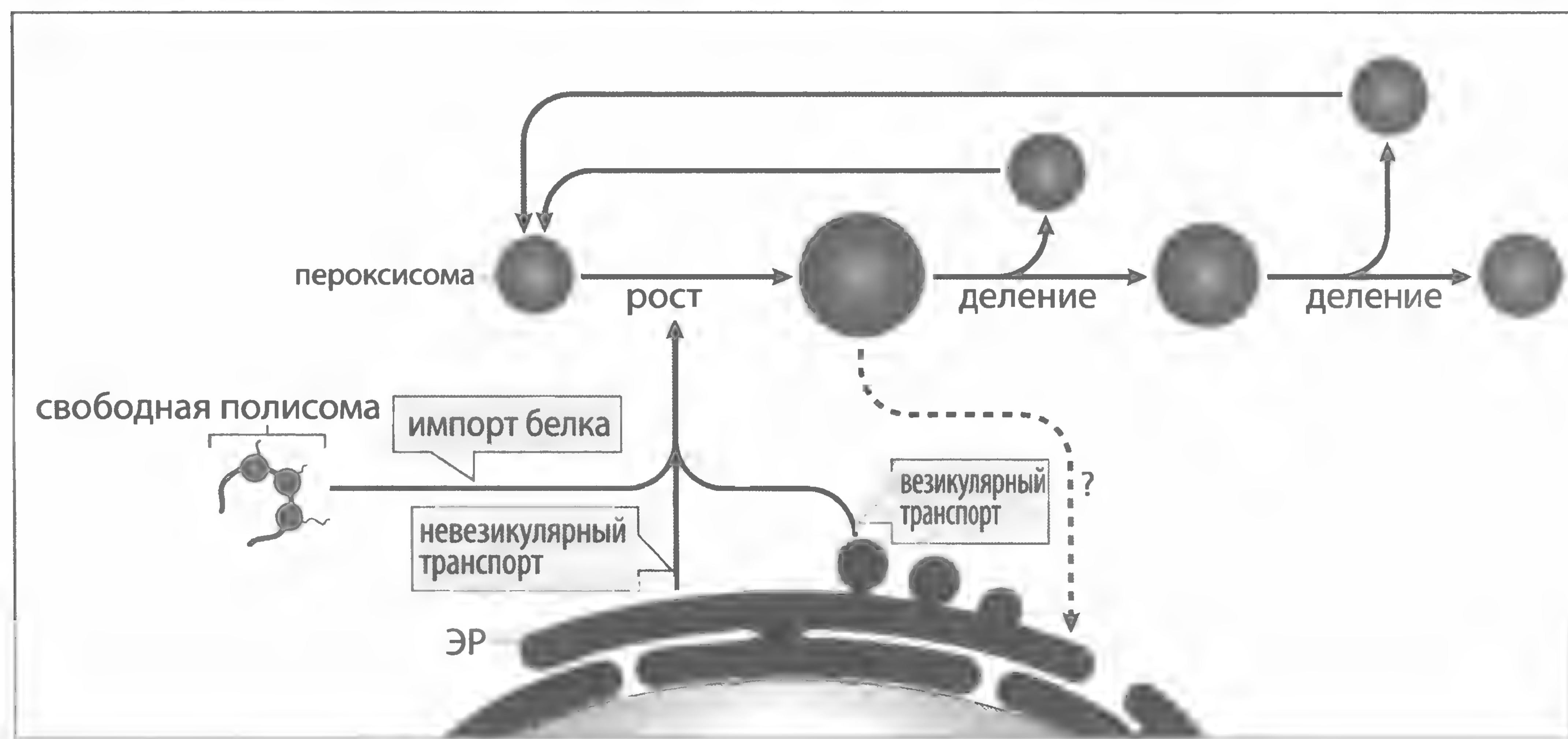


Рис. 70. Рост и цикл деления пероксисом. Мембрана пероксисом растягивается благодаря поступлению материала из ЭР, предположительно, через везикулярный и невезикулярный пути Ретроградный путь еще не продемонстрирован, он мог бы возвращать назад белки ЭР и факторы рециклизации, участвующие в сборке везикул, предназначенных для пероксисомы (пунктирная стрелка). Матричные белки и некоторые белки пероксисомальных мембран приобретаются пероксисомами путем пост-трансляционного импорта из цитозоля. Деление зрелой пероксисомы необходимо для поддержания числа пероксисом в процессе размножения клеток (Fagarasanu et al., 2010).

рикс эти рецепторы возвращаются в цитоплазму для повторного использования в последующих раундах импорта. Экспорт Pex5 зависит от убиквитинирования (ферментативная посттрансляционная модификация белка, мечение белка убиквитином), которое маркирует рецептор для повторного использования (после Pex4-опосредованного моноубиквитинирования) или деградации (после Ubc5/6-опосредованного полиубиквитинирования). Рецепторы убиквитинирования освобождаются из пероксисомальной мембраны путем формирования ААА-типа АТРаза-гетеромультимерного комплекса с помощью Pexl и Pex6 и заякориваются в пероксисомальной мембране с помощью Pex26.

Пероксиновые гены имеют эукариотическое происхождение. Описано множество высоко консервативных пероксинов, которые, по-видимому, представляют собой основу биогенеза пероксисом ранних эукариот. Показана высокая степень сходства предшественников пероксинов с белками пути деградации ЭР, что предполагает общее эволюционное происхождение пероксисом и ЭР.

За исключением микроспоридий, у которых отсутствует большинство *pex* генов, грибы из всех главных таксонов с известными геномами (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota и Basidiomycota) также содержат *ортологи* Pex6, 7, 11, 13, 23, и 24. Присутствие этих белков, вероятно, отражает их значимость для биогенеза пероксисом последнего общего предка грибов.

Анализ протеома *P. anserina* показал наличие комплексов пероксионов, характерных для современных грибов. Исследование распространения пероксинов среди филогенетически разных грибов позволило выявить особенности набора пероксинов, характерных для эволюционно примитивных/ранних грибов, и возможные замены и/или восстановление их в процессе эволюции грибов. Фактически, ключевые пероксины, необходимые для сборки

пероксисом, были охарактеризованы только у грибов. Так, например, связующий белок Pex8 не имеет известного ортолога вне грибов. И, наоборот, некоторые высоко консервативные пероксины были утрачены и/или замещены в ходе эволюции грибов. Белок Pex4 отсутствует у некоторых базидиомицетов, а его заякоривающий белок Pex22 отсутствует у большинства мицелиальных грибов. Роль Pex22 у некоторых таксонов может быть восполнена, благодаря Pex22-подобному белку. Сходно с этим, наиболее убиквитинированный Pex6-заякоренный пероксин Pex26 отсутствует у базидиомицетов и сахаромицетов; однако в последней группе он может быть замещен на Pexl5. Другой эксклюзивный белок представителей Saccharomycetes — компонент стыковки Pexl7p; однако ген, кодирующий гибридный пероксин Pex14/17, присутствует в геноме большинства мицелиальных грибов.

Деление пероксисом является заключительной стадией биогенеза пероксисом и детально изучено на примере почкующихся дрожжей.

7.2.2. Деление пероксисом у грибов

Несмотря на важную роль ЭР в биогенезе пероксисом, популяция пероксисом в клетке во многом контролируется делением предсуществующих пероксисом. Процесс деления включает три морфологически четкие стадии: удлинение пероксисом, сокращение пероксисомальной мембраны и деление органеллы (рис. 71).

Аппарат деления пероксисом

Факторы удлинения. В настоящее время показано, что факторами элонгации/тубуляции пероксисом являются белки из семейства Pex11p. Геном каждого эукариотического организма кодирует множество Pex11p-родственных белков. Так, у *S. cerevisiae* это белки Pex11p, Pex25p и Pex27p. Все Pex11p-родственные белки ведут себя как периферические или интегральные мембранные белки пероксисом. Показано, что члены семейства Pex11p содержат консервативную последовательность на N-конце, которая может принимать фор-



Рис. 71. Молекулярные механизмы деления пероксисом. Пероксисомы делятся асимметрично путем отщепления маленькой дочерней пероксисомы от крупной родительской органеллы. Деление пероксисом состоит из трех этапов: удлинения или тубуляции пероксисом, сжатия пероксисомальной мембраны и непосредственного деления пероксисомы. Механизмы, лежащие в основе удлинения и сжатия, мало понятны. Морфологические наблюдения показали участие пероксисомального мембранного белка пероксина 11 (Pex11) в удлинении пероксисомы. Скорее всего, в тубуляции пероксисом замешана молекулярная машина, которая продвигает пероксисомы к почке, так как точечная мутация по моторному белку миозину 2 (Myo2) или отсутствие рецептора Myo2 на пероксисомальной мембране исключают удлинение пероксисом в клетках. Деление пероксисом происходит при участии динамин-родственных белков. Так, в делении пероксисом у *Saccharomyces cerevisiae* участвуют вакуолярный белок, связанный с сортировкой Vpsl, и менее распространенный динамин-родственный белок Dnml (Fagarasanu et al., 2010).

му амфипатичной спирали; связывание этой спирали с отрицательно заряженными мембранами везикул может приводить к искривлению и тубуляции мембраны пероксисом. Члены семейства Pex11p действуют совместно с другими пероксинами, участвующими в регуляцию размера и числа пероксисом. Скорее всего, в тубуляции пероксисом замешан молекулярный аппарат, который обеспечивает перемещение пероксисомы в дочернюю клетку-почку (см. далее). Точечная мутация по моторному белку миозину 2 (Myo2) или отсутствие рецептора Myo2 на пероксисомальной мембране исключают удлинение пероксисом в клетках, у которых отсутствуют пероксисомальные динаминоподобные белки (DRPs, см. далее).

Факторы сокращения. Наши представления об этой стадии деления во многом гипотетичны. Предполагают участие липидов в этом процессе. Данная гипотеза основана на наблюдении, показавшем, что у дрожжей *Yarrowia lipolytica* деление пероксисом инициируется сигнальным каскадом, регулируемым acyl-CoA оксидазой/Pex16p. Этот каскад берет начало внутри органеллы и, в конце концов, приводит к накоплению диацилглицерина, — мембранного липида, способного индуцировать сильный изгиб пероксисомального бислоя мембраны со стороны цитоплазмы.

Факторы деления. Деление пероксисом охарактеризовано более детально в связи с тем, что белковая машина деления пероксисом имеет общие черты с делением митохондрий. У всех изученных на данный момент организмов финальный этап разделения пероксисом происходит при участии динаминоподобных, адаптерных и мембранных белков (рис. 71). *Динаминоподобные белки* (например, Dnm1p у *Hansenula polymorpha*, Dnm1p и Vps1p у *S. cerevisiae*, DRP3A у растений и DLP1 у животных) представляют собой крупные само-олигомеризующиеся ГТФазы, которые могут образовывать кольцевую структуру вокруг целевой мембраны, стягивать и разрезать эту мембрану при гидролизе ГТФ. Для выполнения функции деления цитозольные динаминоподобные белки должны быть доставлены к целевой мембране. Этот процесс происходит через взаимодействие с растворимыми (Mdv1p у *H. polymorpha* и Mdv1p и Caf4p у *S. cerevisiae*) и заякоренными (Fis1p у *S. cerevisiae* и *H. polymorpha*, и Fis1p и Mff1 у животных) адапторными белками. Белки, родственные гомологам Mdv1p и Caf4p, пока не были обнаружены у высших эукариот. Неизвестно, как заякоренные адапторные белки доставляются к пероксисомальной мембране и обмениваются ли митохондриальные и пероксисомальные пулы этих белков. Однако было показано, что у некоторых организмов эти белки могут взаимодействовать с членами семейства Pex11p. В делении пероксисом у *S. cerevisiae,* вероятно, участвует периферический мембранный белок Inp1, связанный с белком Vps1p, и мембранный белок Inp2, образующий комплекс с моторным белком Myo2.

7.2.3. Деградация пероксисом (рис. 72)

Для регуляции функций пероксисом и ограничения процесса клеточного старения лишние и нефункциональные пероксисомы должны быть выборочно удалены. Биохимические и генетические исследования грибов показали, что деградация пероксисом происходит двумя разными механизмами: макропексофагией и микропексофагией (рис. 72). Макро- и микропексофагия (аналогичные макро- и микроавтофагии) два морфологически четких типа пероксисома-специфичных вакуолярных/лизосомальных путей деградации, которые используют основные механизмы автофагии: (i) в процессе макропексофагии индивидуальные пероксисомы селективно поглощаются вновь образованной двумембранной везикулой — эта структура, называемая пексофагосомой (аналогично автофагосомам), в дальнейшем сливается с вакуолярной/лизосомальной мембраной; (ii) в течение микропексофагии кластер пероксисом постепенно окружается вакуолярными/лизосомальными выступающими мембранами, которые затем замыкаются с формированием чашеобразной двумембранной структуры — микропексо-

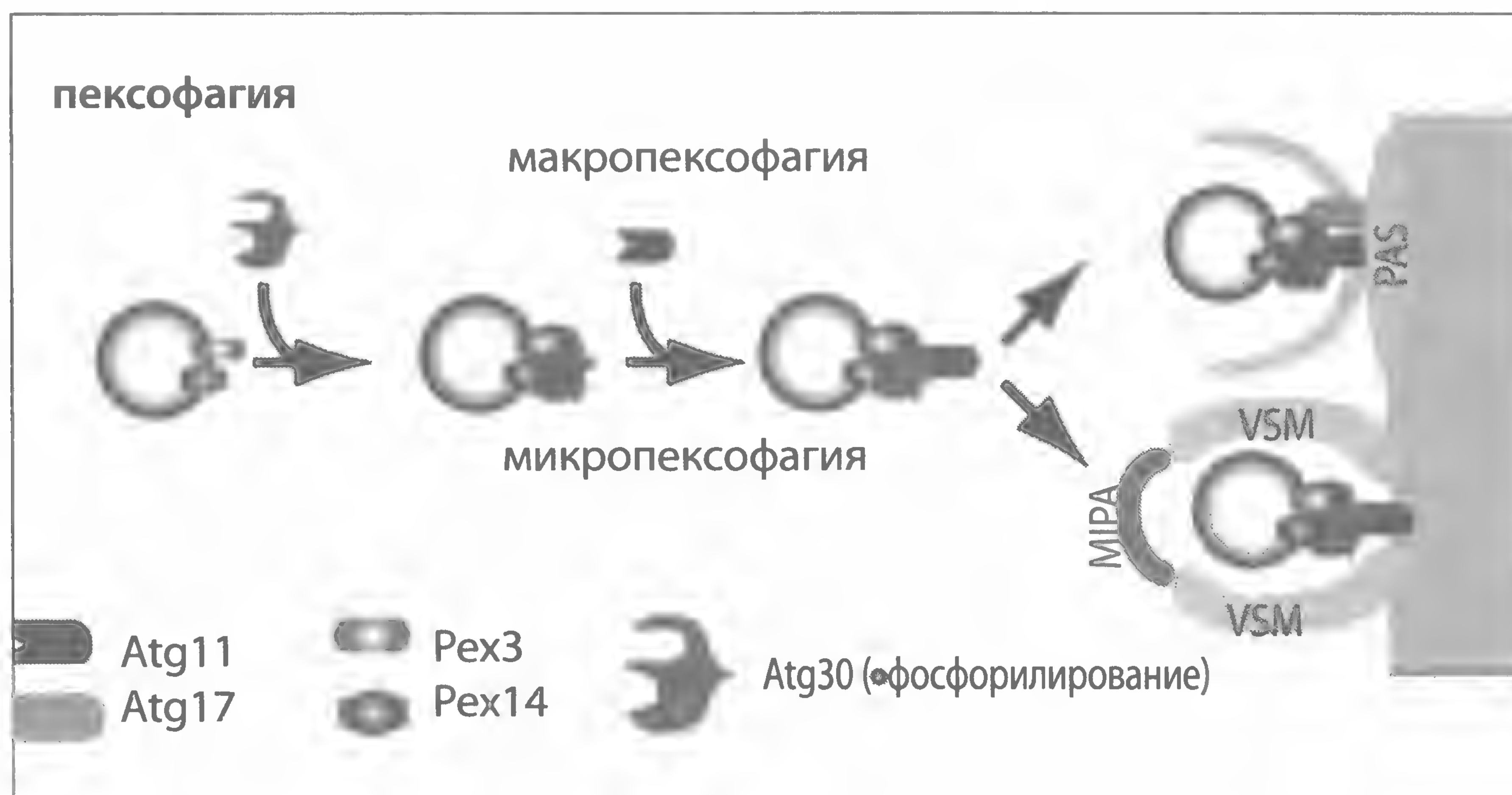


Рис. 72. Молекулярные процессы селективной пексофагии у дрожжей.
Пексофагия у *Pichia pastoris* пероксисом у *P. pastoris*. Белок PpAtg30 индуцируется и связывается с пероксисомальными белками PpPex3 и PpPex14. Вслед за индукцией пексофагии PpAtg30 фосфорилируется и связывается с PpAtg11. PpAtg17 обеспечивает привязку пероксисом к PAS (место сборки фагофора) при макропексофагии. Далее около PAS пероксисомы поглощаются фагофорной мембраной при макропексофагии или вакуолярной мембраной (VSM) с формированием чашеобразной двумембранной структуры — микропексофагия-специфичный мембранный аппарат (MIPA) - при микропексофагии (Kanki et al., 2011).

фагия-специфичный мембранный аппарат (MIPA). Оба типа пексофагии подвергают включенные в лизосому пероксисомы действию гидролаз.

К настоящему времени идентифицировано более 35 AuTophaGy-родственных (*ATG*) генов. Белки, кодируемые этими генами, Atg белки, необходимы для селективного и неселективного автофагического пути. Аппарат автофагии представляет собой базовый молекулярный аппарат, который консервативен для эукариот (от дрожжей до человека). Однако пути селективной деградации пероксисом требуют участия дополнительных компонентов и механизмов для узнавания органелл, подлежащих удалению.

7.2.4. Движение и наследование пероксисом дрожжей

Движение пероксисом у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* и диморфных дрожжей *Y. lipolytica* связано с актиновым цитоскелетом (как у растений), в то время как распределение пероксисом у делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* не зависит от цитоскелета и связано с движением митохондрий.

У *S. cerevisiae* миозин Myo2 отвечает за перемещение в направлении образующейся почки большинства мембранных органелл, включая элементы Гольджи, порцию вакуолей, пероксисомы и митохондрии.

Для достижения правильного наследования пероксисом перенос органелл в почку должен сопровождаться закреплением части популяции органелл в материнской клетке. Органеллы должны также остаться в почке после переноса и быть защищены от возвращения в материнскую клетку. Миозин Myo2 не освобождается сразу после деления органелл и достижения ими нужного местоположения, скорее всего, Myo2 сам отвечает за расположение органелл в материнской клетке и их наследование. После достижения места назначе-

ния пероксисомы переносятся от Myo2 к заякоривающим устройствам, которые, вероятно, одинаковы как в материнской, так и в дочерней клетках.

Пероксисомы занимают строго фиксированное положение в процессе роста почки, что связано с существованием заякоривающего белка/ов. У *S. cerevisiae* обнаружен белок Inp1, который закрепляет пероксисомы у кортекса клетки. Это белок наследования пероксисом 1 = **In**heritance of **p**eroxisomes protein 1 (Inp1), периферический мембранный белок, выполняющий особую роль в иммобилизации пероксисом к клеточному кортексу. Белок Inp1 также участвует в делении пероксисом. Показана его связь с динамин-родственными белками аппарата деления пероксисом Vps1 и Pex25.

Что же обеспечивает равное распределение пероксисом между материнской и дочерней клетками?

Пока большинство пероксисом остаются неподвижными у кортекса материнской клетки во время роста почки, некоторые пероксисомы отрываются одна за другой от своих мест прикрепления и двигаются быстро и направленно к дочерней клетке. Наследование пероксисом может по существу рассматриваться как баланс между процессом, который обеспечивает поддержание популяции пероксисом в материнской клетке, и процессом переноса оставшейся части пероксисом в дочернюю клетку. Клетки должны координировать это перетягивание каната из органелл для достижения успешного наследования. И в этом процессе участвует еще один важный белок пероксисом Inp2, который является рецептором миозина Myo2.

Ранее было сказано, что Myo2 — это связанный с актином моторный белок *S. cerevisiae*, отвечающий за движение большинства органелл, включая пероксисомы, в почку. Получены доказательства, что Inp2 — пероксисомальный мембранный белок, необходимый для локализации пероксисом в почке. Inp2 отвечает за положение пероксисом в клетке в ответ на сигналы клеточного цикла. Уровень Inp2 изменяется в процессе клеточного цикла таким образом, что коррелирует с динамикой пероксисом. Предполагается, что колебания в уровне Inp2 приводит к сборке и разборке транспортного комплекса Inp2–Myo2 у пероксисомальной мембраны. Уровень белка Inp2 низкий на ранних этапах почкования, когда только несколько пероксисом показывают подвижность в сторону почки, и высокий (пиковый) в средних по размеру почкующихся клетках, когда происходит миграция большинства пероксисом в дочернюю клетку. Позднее в клеточном цикле, когда примерно половина пероксисом перейдет в почку, уровень Inp2 начинает снижаться и возвращается к базовому значению перед цитокинезом. Количество Inp2 на индивидуальную пероксисому резко меняется. Особо выделяются по заметному уровню Inp2 пероксисомы, которые переносятся в почку при участии Myo2. Создание градиента Inp2 вдоль оси деления дает возможность объяснить равное распределение пероксисом при нормальном клеточном делении.

Для дрожжей *Y. lipolytica* было продемонстрировано участие белка Pex3B (член семейства пероксионов Pex3) в подвижности пероксисом через взаимодействие с моторным белом миозином V.

7.2.5. Функции пероксисом

Ранние исследования белков пероксисом показали существование почти 50 ферментов. Последние данные продемонстрировали, что пероксисомы почкующихся дрожжей, мицелиального гриба *P. anserina* и цветкового растения *Arabidopsis thaliána* содержат примерно 200 пероксисомальных белков. Известные пероксисомальные ферменты вовлечены в разные анаболические или катаболические пути, часть из которых повсеместны, в то время как другие более специфичны.

Рассмотрим общие и специфические функции пероксисом.

7.2.5.1. Общие функции

Общие функции включают пероксисомальный путь β-окисления жирных кислот. Этот путь вместе с митохондриальным путем β-окисления позволяет мицелиальным грибам использовать разные жирные кислоты. Пероксисомальный путь превращает жирные кислоты в ацетил-коэнзим А (acetyl-CoA), важный интермедиат в клеточном метаболизме, участвующий в нескольких путях биосинтеза. В глиоксилатном цикле пероксисом ацетил-CoA участвует в синтезе углеводов, которые используются в разных метаболических путях клетки (см. главу «Метаболизм»). Более того, анализ мутантов у разных видов грибов показал, что пероксисомальный путь β-окисления жирных кислот является источником ацетил-CoA в синтезе меланина. Пероксисомальный путь β-окисления некоторых жирных кислот приводит к формированию пимелиновой кислоты, предшественника биотина (витамин Н или B_7).

Пероксисомы и митохондрии имеют не только общий аппарат деления, но и представляют собой метаболически связанные органеллы. Они кооперируются в β-окислении жирных кислот и в метаболизме активных форм кислорода. В связи с этим можно ожидать общую координацию в биогенезе этих органелл, на что может указывать совместная локализация и контакты в клетке (делящиеся дрожжи, шампиньон двуспоровый).

Помимо участия пероксисом в β-окислении жирных кислот, пероксисомы мицелиальных грибов участвуют в нескольких метаболических путях, таких как метаболизм пурина и аминокислот. В этих путях участвуют оксидазы пероксисом (ацил-CoA оксидаза, оксидаза D-аминокислот, уратоксидаза и др.), которые образуют H_2O_2. Свободные радикалы и их производные играют важную роль в путях сигнальной трансдукции в клетке, однако они также высоко токсичны. Поэтому пероксисомы содержат антиоксидантные ферменты (пероксидазы и каталазы) для регуляции уровня АФК. У мицелиальных грибов наблюдается одновременное присутствие ферментов, которые образуют и убирают H_2O_2. Первая ступень β-окисления жирных кислот обычно катализируется ацил-CoA оксидазой. В этой реакции образуется эноил-CoA и H_2O_2; H_2O_2 восстанавливается до H_2O каталазой. Хотя оба эти фермента локализованы в пероксисомах у *A. nidulans*, пероксисомы *N. crassa* содержат ацил-CoA дегидрогеназу вместо ацил-CoA оксидазы (и поэтому в процессе β-окисления жирных кислот не образуется H_2O_2); в этих пероксисомах каталаза не обнаружена.

Имеется высокая вероятность, что дефекты биогенеза пероксисом нарушают гомеостаз АФК. Повреждение пероксисом может нанести значительный удар по клеточной физиологии, согласно ключевой роли свободных радикалов в сигнальных путях.

7.2.5.2. Специфические функции

Растения, дрожжи и мицелиальные грибы проявляют широкий спектр пероксисомальной активности, главным образом благодаря существованию пероксисома-специфических функций.

Несколько видов мицелиальных грибов (главным образом *Aspergillus nidulans* и *Penicillium chrysogenum*) образуют один из широко используемых антибиотиков пенициллин. Биосинтез этого вторичного метаболита строго компартментализованный процесс и катализируется тремя ферментами. Последняя стадия биосинтеза пенициллина (проводимая ацилтрансферазой) происходит в пероксисомах.

Метилотрофность строго ограничена числом микроорганизмов и только несколько видов дрожжей (метилотрофных дрожжей: *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*) способны к использованию метанола в качестве единственного источника углерода. У растущих на метаноле клеток дрожжей пероксисомы содержат три ключевых фермента метаболизма метанола: алкогольоксидазу (АО), дигидрок-

сиацетон-синтазу (DHAS) и каталазу (CAT). У этих дрожжей алкогольоксидаза, локализованная в пероксисомах, катализирует первую ступень потребления метанола с образованием формальдегида, цитотоксичного компонента, который в дальнейшем окисляется до углекислого газа. Обилие пероксисом в этих клетках связано с очень высоким уровнем ферментов АО и DHAS (приблизительно до 70% от общего клеточного белка). Высокая концентрация АО внутри органеллы приводит к кристаллизации этого белка, что отражается в типичной кубоидной форме органелл (рис. 69В). В то время как растущие на метаноле клетки переполнены крупными пероксисомами, ситуация при росте на глюкозе полностью противоположна, так как синтез АО и DHAS полностью репрессирован и клетки содержат только одну или несколько маленьких пероксисом на клетку.

Метилотрофные виды дрожжей способны утилизировать несколько органических источников азота, таких как первичные амины, аминокислоты, которые метаболизируются пероксисомальными оксидазами. Например, аминооксидаза утилизирует метиламин и этиламин, уреатоксидаза и оксидаза D-аминокислот утилизируют D-аланин. Вместе с этими оксидазами также индуцируется пероксисомальная каталаза, а пероксисомы увеличиваются в размере и числе. Клетки *C. boidinii* способны утилизировать D-аланин в качестве источника углерода и азота. То есть весь углерод и азот, требующиеся для роста и размножения клеток *C. boidinii*, проходят через пероксисомы, что сопровождается процессом их быстрого размножения.

Получены доказательства участия пероксисом в синтезе сидерофоров (вещества переводящие железо в растворимую форму) у *A. nidulans* и *A. fumigatus*.

7.3. Тельца Воронина

Первое сообщение о тельцах Воронина у эуаскомицетного гриба *Ascobolus pulcherrimus* было сделано русским микологом Михаил Степановичем Ворониным в 1864 году. Тельца Воронина постепенно были обнаружены у многих сумчатых мицелиальных грибов, включая патогены животных и человека. Наблюдения проведенные на представителях Euascomycetes, показали, что эта монофилетическая группа грибов имеет общего предка (рис. 73).

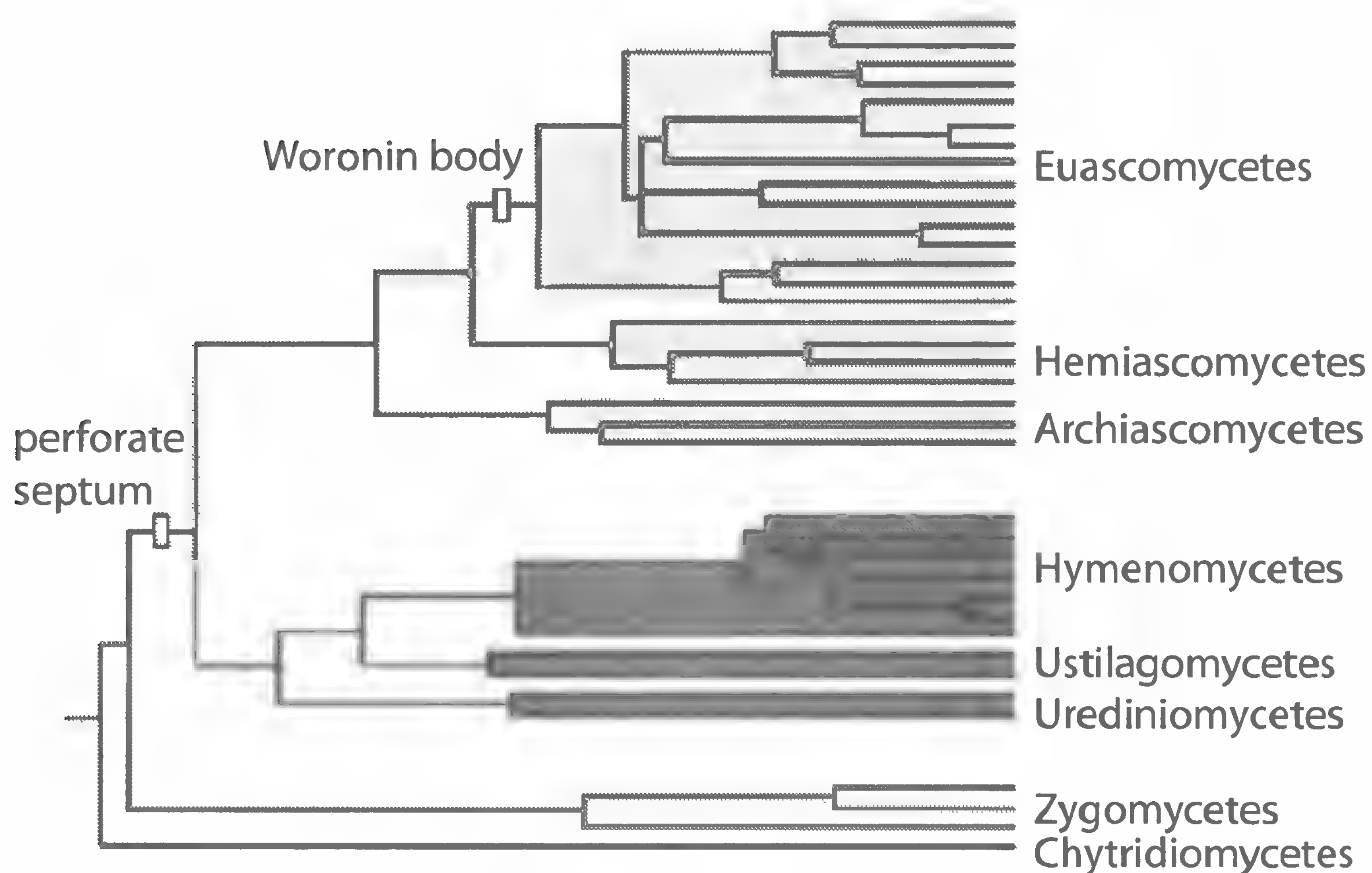


Рис.73. Филогенетическое древо грибов (рабочая модель) построено на базе 18S рРНК (мод. по: Berbee, Taylor. 2001). Ascomycetes и Basidiomycetes закрашены *светло-серым* и *темно-серым* цветом соответственно. Вне шкалы обозначено филогенетическое происхождение перфорированной септы и телец Воронина (Dhavale, Jedd, 2007).

7.3.1. Морфология и структура телец Воронина

На ультратонких срезах (ТЭМ) тельца Воронина (ТВ) выглядят как плотные осмиофильные сердцевины, окруженные одинарной мембраной (рис. 74). В некоторых случаях эти структуры наблюдали в матриксе пероксисом, что может свидетельствовать об образовании телец Воронина в этих органеллах. Сердцевина телец Воронина у большинства видов грибов имеет сферическую форму (рис. 74), а у *N. crassa* она имеет форму гексагонального диска (рис. 75). Обработка протеазой залитых в смолу срезов показала. что сердцевина - это белок.



Рис. 74. Тельца Воронина у *Podospora anserina* округлой формы (стрелки. ТЭМ) Масштабный отрезок 500 нм. Фото О.А. Кудрявцевой.

Размер телец Воронина варьирует от 100 нм до 1 мкм; этот разброс видоспецифичен и всегда незначительно превышает внутренний диаметр септальной поры. У большинства видов грибов тельца Воронина расположены в непосредственной близости от септы с двух сторон от нее (рис. 74, 75), они могут даже касаться поры, показывая связь с ней. Присутствие привязки ТВ к септальной поре было подтверждено экспериментами с лазерными ножами: тельца Воронина, оттянутые прочь от септы. быстро возвращались к исходному положению.

Тельца Воронина были впервые изолированы из *N. crassa* при использовании центрифугирования в градиенте плотности и показано присутствие в них уникального для Euascomycetes белка HEX-1 с молекулярной массой 19 кДа. Известны две изоформы белка Hex-1, отличающиеся структурой N-конца. Одна изоформа Hex-1 образует шаровидную форму сердцевины телец Воронина, например, у *M. grisea*, *Aspergillus oryzae* и *Trichoderma reesei*, другая — гексагональную форму сердцевины *N. crassa.*

Очищенный рекомбинантный Hex-1 *N. crassa* спонтанно самособирается в гексагональные кристаллы, структура этих кристаллов определена с разрешением 1.8Å. Мономер Hex-1 имеет двудоменную структуру, состоящую из взаимно перпендикулярных антипаралельных β-цилиндров (рис. 76). Интересно, что форма этих структур сходна с архитектурой домена у двух архебактериальных белков eIF5-A (рис. 76A, B, C). eIF-5A белки очень консервативны от архебактерий до человека и играют роль в транспорте мРНК или метаболизме тРНК.

Самосборка мономеров Hex-1 в кристаллическую решетку происходит через три внутримолекулярных контакта называемых группа I, группа II и группа III. Взаимосвязи групп I и II приводят к формированию спирального филамента (рис. 76E), а группа III формирует



Рис. 75. Тельца Воронина у *Neurospora crassa* гексагональной формы (ТЭМ). Масштабный отрезок 500 нм (Peraza-Reyes et al., 2010).

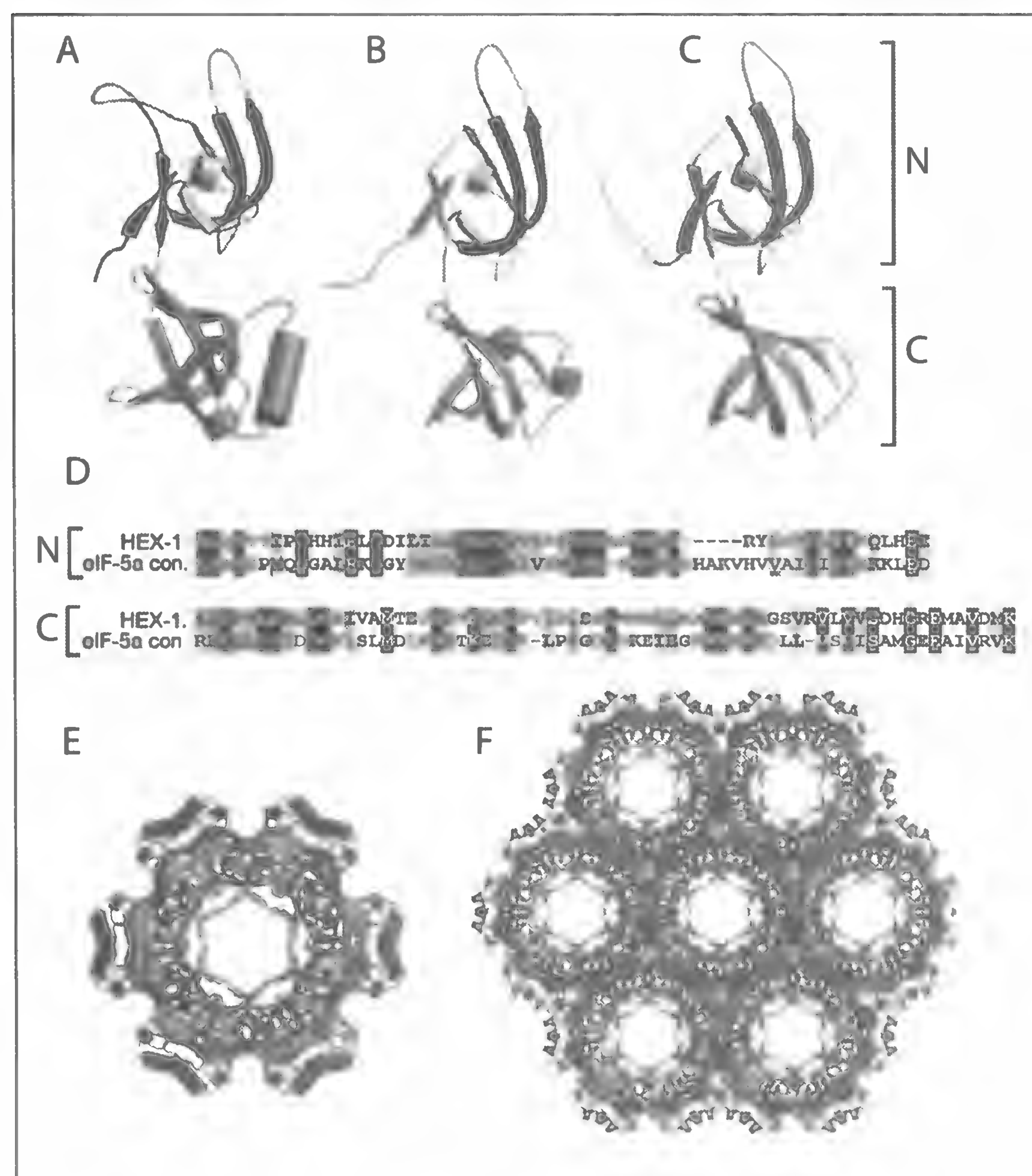


Рис. 76. Структура кристаллической решетки HEX-1 и eIF-5A. Общая структура HEX1 у *Neurospora crassa* (A) и eIF-5A из *Pyrobaculum aerophilum* (B) и *Methanococcus jannaschii* (C). N-Терминальный (*N*) и С-терминальный домены (*C*) отмечены *справа*. Beta-структуры и alpha-спиральные районы отмечены *жирными стрелками* и *цилиндрами* соответственно. (D) N- и С-терминальные домены HEX-1 *N. crassa* выровнены с последовательностями eIF-5A. Идентичные остатки отмечены *черным*, консервативные *серым*. (E) HEX-1 мономеры взаимодействуют через переменные Группы I и Группы II, при контакте образуют биспиральный филамент. (F) Группа III собирает эти филаменты с образованием кристаллической решетки (Dhavale, Jedd, 2007).

поперечные связи этих филаментов. С каждым мономером контактирует 6 идентичных соседних (рис. 76F). Эти упакованные продукты имеют гексагональную симметрию нативных телец Воронина *N. crassa*.

7.3.2. Биогенез телец Воронина

Тельца Воронина обнаружены во всех вегетативных гифах и формируются *de novo* без деления предсуществующих телец Воронина. Так как тельца Воронина в основном превышают диаметр поры, маловероятно, чтобы они транспортировались от мест синтеза к месту функционирования через несколько септальных пор Поэтому, скорее всего, они формируются раньше в процессе роста гифы и распределяются в каждую клетку после деления ядра и цитокинеза одновременно с другими органеллами. Действительно с помощью световой микроскопии, а позднее и электронной у разных представителей Euascomycetes было показано, что тельца Воронина присутствуют в апикальном компартменте (рис. 77). Была прослежена динамика распределения телец Воронина у *A. nidulans*, начиная с ранней стадии прорастания конидии. На ранней стадии в ростковых трубках *A. nidulans* тельца Воронина встречаются в большом количестве. На стадии формирования первой септы несколько телец Воронина обнаружены у кончика гифы, а часть локализованы в районе септы, что говорит о связи септирования и процесса ретроградного транспорта апикально расположенных телец Воронина к септе. Около второй, третьей и т. д. септы, как правило, обнаруживается по два тельца Воронина с каждой стороны септы.

Конфокальная микроскопия *N. crassa* позволила непосредственно наблюдать биогенез телец Воронина в живых гифах. В апикальных клетках наблюдали плотную сердцевину те-

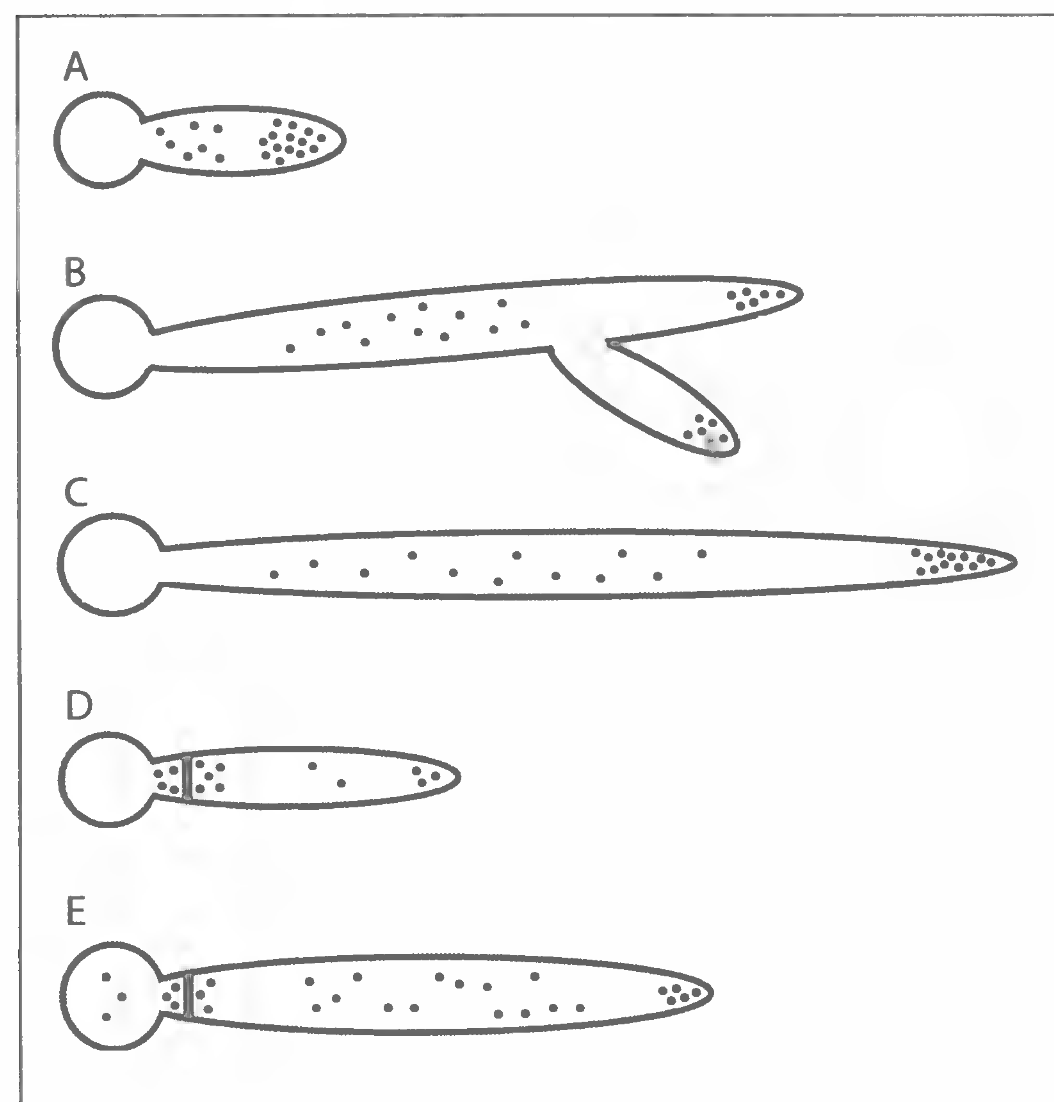


Рис. 77. Диаграмма положения телец Воронина по данным серийных срезов через гифы *Aspergillus nidulans*. Тельца Воронина обнаруживаются в апикальной, субапикальной, септальной или базальной областях по мере роста ростковой трубки на примере пяти проросших конидий (А Е). Все тельца Воронина показаны диспропорционально большие для ясности (Momany et al., 2002). Пояснения: базальная область — в конидии; септальная область — на расстоянии 2,5 мм с двух сторон от септы; субапикальная область — 2,5 мм выше септы и за 2,5 мм до кончика; апикальная – менее 2,5 мм до кончика.

лец Воронина в матриксе необычно крупных пероксисом и этот комплекс двигался динамично в направлении кончика гифы. После созревания происходит отпочковывание телец Воронина от материнской пероксисомы. На ранних этапах формирования они имеют гексагональную форму, позднее становятся сферическими (за исключением *N. crassa*). Движение апикально расположенных телец Воронина в процессе созревания включает формирование связи с кортексом клетки во время септирования. Тельца Воронина становятся иммобилизованы и исключаются из протоплазматического течения. Таким образом, длительное образование телец Воронина в апикальных компартментах и их последовательная передача в субапикальные компартменты через кортикальные ассоциации обеспечивает все компартменты необходимым количеством телец Воронина.

Какие факторы определяют локализацию этого процесса в апикальных клетках? Экспрессия флуоресцентного белка Hex-1 демонстрирует высокий градиент флуоресценции на кончике, который снижается по направлению к субапикальным клеткам, и это предполагает, что экспрессия гена *hex-1* поляризована к апикальному компартменту. Эти эксперименты демонстрируют апикальную запрограммированность экспрессии гена и предполагают возможную роль локализованных транскриптов *hex-1* в апикальном формировании телец Воронина. Таким образом, локализация транскриптов *hex-1* является ключевой детерминантой локализации формирования телец Воронина.

Связь между пероксисомами и тельцами Воронина осуществляется при участии предназначенной для пероксисом сигнальной последовательности на С-конце белка Hex-1. Цейтраферная съемка продемонстрировала, что тельца Воронина отпочковываются от пероксисом *N. crassa* и что биогенез телец Воронина требует присутствия пероксинов, которые являются посредниками импорта белков в пероксисомы. Периферический мембранный пероксисомальный белок Pex11 причастен к размножению и делению пероксисом. При отсутствии Pex11 мицелиальные грибы содержат только несколько крупных пероксисом. Было также продемонстрировано у Pex11-дефицитного штамма *A. oryzae* сокращение способности обеспечивать целостность цитоплазмы на 30% по сравнению с диким штаммом. В отсутствие Pex11 белок телец Воронина Hex1 формирует структуру, которая прикрепляется к матриксной стороне пероксисомальной мембраны, но зрелые тельца Воронина не способны дифференцироваться из пероксисом. Специфичный для Pezizomycotina белок WSC (Woronin body sorting complex) отвечает за доставку Hex1 к матриксной стороне пероксисомальной мембраны и облегчает отпочковывание тельца Воронина. Высказано предположение, что Pex11 растягивает пероксисомальную мембрану, облегчая деление

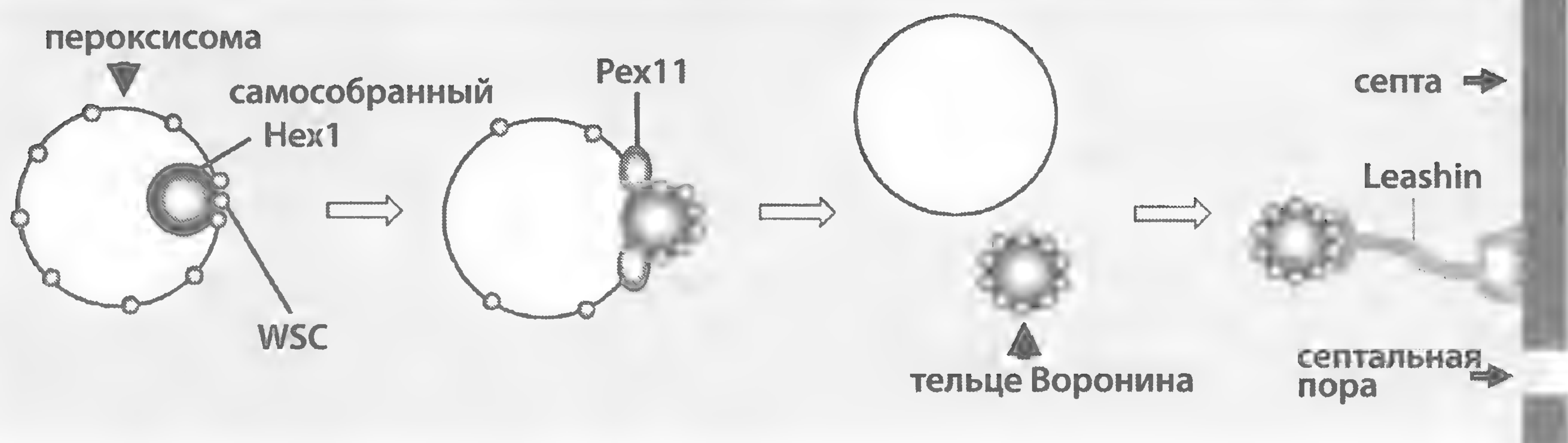


Рис. 78. Дифференциация телец Воронина из пероксисом (схема).
Обозначения: Pex 11 — пероксин, участвующий в отделении тельца Воронина от пероксисомы; Leashin – белок который привязывает тельце Воронина к септе; WSC — (Woronin body sorting complex) отвечает за доставку Hex1 к матриксной стороне пероксисомальной мембраны и облегчает отпочковывание тельца Воронина (Maruyama and Kitamoto, 2013).

пероксисом с помощью динамин-родственных белков Гетерологичная экспрессия Hex1 у дрожжей *S. cerevisiae* подтверждает участие динамин-родственных белков в отпочковывании телец Воронина от пероксисомы. ApsB, компонент центра организации микротрубочек (ЦОМТ, подробнее см. в главе «Цитоскелет»), взаимодействует с Hex1 и локализуется в пероксисоме с использованием сигнальной последовательности 2 (PTS2). Hex1 физически связан со специальным матриксным импортируемым белком Pex26 и способствует накоплению Pex26 у мембран дифференцирующихся пероксисом. После отделения телец Воронина от пероксисомы специфичный для Pezizomycotina белок Leashin (LAH), привязывает тельца Воронина по соседству от септы. Модель дифференциации ТВ из пероксисом представлена на рис. 78. Еще предстоит идентифицировать ряд белков функционально/пространственно связанных с тельцами Воронина, чтобы выяснить молекулярный механизм биогенеза этих структур.

7.3.3. Функция тельца Воронина

Тельца Воронина в момент опасности закупоривают септальные поры (см. главу «Септы и цитокинез») поврежденных клеток, отделяя их от неповрежденных клеток. Плотная кристаллическая структура сердцевины выполняет функцию противостояния внутреннему осмотическому давлению клеток при закупоривании септальной поры.

Эта функция была оценена количественно на *Penicillium chrysogenum,* где тельца Воронина блокировали 90% септальных пор при индукции опасности и только 5% — в гифах, не подвергающихся опасности Электронная микроскопия в дальнейшем показала, что при повреждении клетки и закупоривании поры септы материал клеточной стенки откладывается около комплекса тельце Воронина — септальный поровый канал, что дает возможность в дальнейшем быстро распломбировать канал и возобновить рост кончика. Анализ мутантов *hex-1* у разных Euascomycetes показал, что тельца Воронина выполняют консервативную функцию закупоривания септальной поры в случае опасности. Мутант с делецией *hex-1 N. crassa,* лишенный видимых телец Воронина, имеет дефекты в закупоривании поры, а также замедленную регенерацию клетки во время повреждения. Кроме того, воздушные гифы таких мутантных штаммов спонтанно лизируются, клетки истекают

цитоплазмой, обладают заниженной способностью к образованию неполовых спор (конидий). Мутанты *hex-1* у *M. grisea* и *A. oryzae* также не имеют видимых телец Воронина и проявляют дефекты, связанные с закупориванием поры в случае опасности. Дополнительно к дефектам в закупоривании мутант *M. grisea hex-1* также дефектен в морфогенезе аппрессория, росте внутри клеток растения-хозяина и гибели клеток при азотном голодании. Таким образом, тельца Воронина снабжают *M. grisea* важной оборонительной системой во время роста внутри растения хозяина, и эта система может регулироваться через неизвестное соединение на фоне азотного голодания.

Недавно было показано на мицелии *A. oryzae*, что регулярное закупоривание септальной поры ТВ происходит и в процессе нормального роста гифы. Эта функция может представлять собой примитивный способ регуляции взаимодействия между клетками мицелия грибов.

Литература

Bartoszewska M., Opaliński Ł., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2011. The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi // Biotechnol Lett. Vol.33. P.1921–1931.

Berbee M.L., Taylor J.W. 2001. [Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. 10] // D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, P.A. Lemke (eds.). The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Volume VII: Systematics and Evolution. Part B. Berlin. Heiledberg: Springer-Verlag. P.229–245.

Chang J., Fagarasanu A., Rachubinski R.A. 2007. Peroxisomal peripheral membrane protein YlInp1p is required for peroxisome inheritance and influences the dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica* // Eukaryotic Cell. Vol.6. No.9. P.1528–1537.

Delille H.K., Alves R., Schrader M. 2009. Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: linked by division // Histochem Cell Biol. Vol.131. P.441–446.

Dhavale T., Jedd G. 2007. [The fungal Woronin body. 3] // R.J. Howard, N.A.R. Gow (eds.). Biology of the Fungal Cell. 2nd Edition The Mycota. VIII. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.87–96.

Dunn W.A., Cregg J.M., Kiel J.A.K.W., van der Klei I.J., Oku M., Sakai Y., Sibirny A.A., Stasyk O.V., Veenhuis M. 2005. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes // Autophagy. Vol.1. No.2. P.75–83.

Fagarasanu A., Mast F.D., Knoblach B., Rachubinski R.A. 2010. Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast // Molecular cell Biology. Nature Reviews. Vol. 11. P. 644–654.

Farre J.C., Manjithaya R., Mathewson R.D., Subramani S. 2008. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy // Dev Cell. Vol.14. P.365–376.

Farre J.C., Subramani S. 2004. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process // Trends in Cell Biology. Vol.14. No.9. P.515–523.

Fransen M. 2012. Peroxisome dynamics: molecular players, mechanisms, and (dys)functions. Review Article // International Scholarly Research Network ISRN Cell Biology. Vol.2012. P.1–24.

van der Giezen M., Birdsey G.M.,. Horner D.S., Lucocq J., Dyal P.L., Benchimol M., Danpure C.J., Embley T.M. 2003. Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins // Mol. Biol. Evol. Vol. 20. No 7. P. 1051–1061.

Gründlinger M., Yasmin S., Lechner B.E., Geley S., Schrett M., Hynes M., Haas H. 2013. Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes // Molecular Microbiology. Vol.88. No.5. P.862–875.

Guo T., Gregg C., Boukh-Viner T., Kyryakov P., Goldberg A., Bourque S., Banu F., Haile S., Milijevic S., San K.H.Y, Solomon J., Wong V., Titorenko V.I. 2007. A signal from inside the peroxisome initiates its division by promoting the remodeling of the peroxisomal membrane // The Journal of Cell Biology. Vol.177. No.2. P.289–303.

Haan G.J., Baerends R.J., Krikken A.M., Otzen M., Veenhuis M., Klei I.J. 2006. Reassembly of peroxisomes in *Hansenula polymorpha* pex3 cells on reintroduction of Pex3p involves the nuclear envelope // FEMS. Yeast Res. Vol.6. P.186–194.

Imazaki A., Tanaka A., Harimoto Y., Yamamoto M., Akimitsu K., Park P., Tsuge T. 2010. Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternate* // Eukaryotic Cell. Vol.9. No.5. P.682–694.

Jourdain I., Sontam D., Johnson C., Dillies C., Hyams J.S. 2008. Dynamin-dependent biogenesis, cell cycle regulation and mitochondrial association of peroxisomes in fission yeast // Traffic. Vol.9. P.353–365.

Kanki T, Klionsky D.J., Okamoto K. 2011. Mitochondria Autophagy in Yeast // Antioxidants & Redox Signaling. Vol.14. No.10. P.1989–2001.

Kiel J.A.K.W., van der Klei I.J. 2009. Proteins involved in microbody biogenesis and degradation in *Aspergillus nidulans* // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. S62–S71.

van der Klei I., Veenhuisv M. 2006. Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1763. P.1364–1373.

Li L., Wang., Zhang Z., Wang Y., Liu M., Jiang H., Chai R., MaoX., Qiu H., Liu F., Sun G. 2014. MoPex19, which is essential for maintenance of peroxisomal structure and Woronin bodies, is required for metabolism and development in the rice blast fungus // PLoS ONE. Vol.9. No.1. e85252.

Liu F., Ng S.K., Lu Y., Low W., Lai J., Jedd G. 2008. Making two organelles from one: Woronin body genesis by peroxisomal protein sorting // JCB. Vol.28. P.325–339.

Maruyama J-i., Kitamoto K.K. 2013. Expanding functional repertoires of fungal peroxisomes: contribution to growth and survival processes. Review Article // Frontiers in Physiology. Vol.17. No.4. P.177 (1–10).

Matsuzaki T., Fujiki Y. 2008. The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway // J. Cell Biol. Vol.183. P.1275–1286.

Meijer W.H., van der Klei I.J., Veenhuis M., Kiel J.A. 2007. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes // Autophagy. Vol.3. P.106–116.

Momany M., Richardson E.A., Van Sickle C. 2002. Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans* // Mycologia. Vol.94. No.2. P.260–266.

Motley A.M., Hettema E.H. 2007. Yeast peroxisomes multiply by growth and division // J Cell Biol. Vol.178. P.399–410.

Nagotu S., Krikken A.M., Otzen M., Kiel J.A., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2008. Peroxisome fission in *Hansenula polymorpha* requires Mdv1 and Fis1, two proteins also involved in mitochondrial fission // Traffic. Vol.9. P.1471–1484.

Peraza-Reyes L., Espagne E., Arnaise S., Berteaux-Lecellier V. 2010. [Peroxisomes in filamentous fungi. 15] // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington. DC: ASM Press. P.191–206.

Raychaudhuri S., Prinz W.A. 2008. Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.105. P.15785–15790.

Sakai Y., Oku M., van der Klei I.J., Kiel J.A.K.W. 2006. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes // BBA Mol. Cell Res. Vol.1763. P.1767–1775.

Sulter G.J., Looyenga L., Veenhuis M., Harder D.W. 1990. Occurrence of peroxisomal membrane proteins in methylotrophic yeasts grown under different conditions // Yeast. Vol.6. P.35–43.

Tey W.K., North A.J., Reyes J.L., Lu Y.F., Jedd G. 2005. Polarized gene expression determines Woronin body formation at the leading edge of the fungal colony // Mol Biol Cell. Vol.16. P.2651–2659.

Titorenko V.I., Mullen R.T. 2006. Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER // J. Cell Biol. Vol.174. P.11–17.
Titorenko V.I., Rachubinski R.A. 2004. The peroxisome: orchestrating important developmental decisions from inside the cell // J. Cell Biol. Vol.164. No.5. P.641–645.
Veenhuis M., Salomons F.A., van der Klei I.J. 2000. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis // Microscopy Research and Technique. Vol.51. P.584–600.
Voncken F.G.J., Boxma B., van Hoek A.H.A.M., Akhmanova A.S., Vogels G.D., Huynen M., Veenhuis M., Hackstein J.H.P. 2002. A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2 // Gene. Vol.284. P.103–112.
Waterham H.R., de Vries Y., Russell K.A., Xie W., Veenhuis M., Cregg J.M. 1996. The *Pichia pastoris PER6* gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1 // Molecular and Cellular Biology. Vol.15. No.5. P.2527–2536.
Zekert N., Veith D., Fischer R. 2010. Interaction of thc *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs // Eukaryotic Cell. Vol.9. No.5. P.795–805.

Глава 8.
Митохондрии и гидрогеносомы[1]

8.1. Общие представления и функции

Митохондрии (от греч. μίτος — нить и χόνδρος — зёрнышко, крупинка) — самовоспроизводящиеся полуавтономные двумембранные органоиды клетки, содержащие собственный геном. Митохондриальный геном грибов, в отличие от ядерного, представляет собой одну или несколько кольцевых молекул ДНК (мтДНК). Митохондрии характерны за малым исключением для всех эукариотических клеток как аутотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных (животные, грибы) организмов. Митохондрий нет у некоторых облигатных анаэробных грибов, обитающих в желудке травоядных животных.

Митохондрии — это мультифункциональные полиморфные органеллы, выполняющие важнейшие функции в клетках эукариотических организмов. Митохондрии осуществляют процесс дыхания, генерируют энергию посредством окислительного фосфорилирования, играют ключевую роль в сборке железо-серных кластеров, участвуют в промежуточном метаболизме, обеспечивают передачу/генерацию кальциевых сигналов и задействованы в *апоптозе*.

Исследование тонкой структуры митохондрий различных грибов позволило отметить принципиальное сходство с таковой у высших организмов (рис. 79). Они окружены двойной мембраной и содержат от 800 (дрожжи) до 1500 (у человека) разных белков. Поверхность внутренней мембраны больше, чем внешней. Существенное увеличение поверхности внутренней мембраны митохондрий связано с наличием впячиваний — *крист,* которые внедрены в матрикс органеллы. У грибов из отделов Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota и Basidiomycota за некоторым исключением кристы пластинчатые, в отличие от высших растений и Oomycota, у которых кристы трубчатые. На внутренней мембране расположены белковые комплексы дыхательной цепи. В матриксе находятся растворимые ферменты (в частности, цикла Кребса, β-окисления жирных кислот, цикла мочевины), митохондриальная ДНК, а также рибосомы и низкомолекулярные полифосфаты. Последние обнаружены у

---

[1] Сокращения

АО — альтернативная оксидаза
кДНК — комплементарная ДНК, последовательность ДНК, синтезированная на матрице зрелой мРНК
мтДНК (англ. mtDNA) — митохондриальная ДНК
МП — мембранный потенциал
ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия
ФАД — флавинадениндинуклеотид
ФМН — флавинмононуклеотид
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот
ЭР — эндоплазматический ретикулум
DIC (англ. differential interference contrast) — метод дифференциального интерференционного контраста (контраст Номарского)
Q — убихинон
PAS (англ. phagophore assembly site) — место сборки мембраны фагофора, окружающей будущую фагосому
SDH — сукцинатдегидрогеназа
SHAM (англ. salicylhydroxamic acid) — салицилгидроксамовая кислота

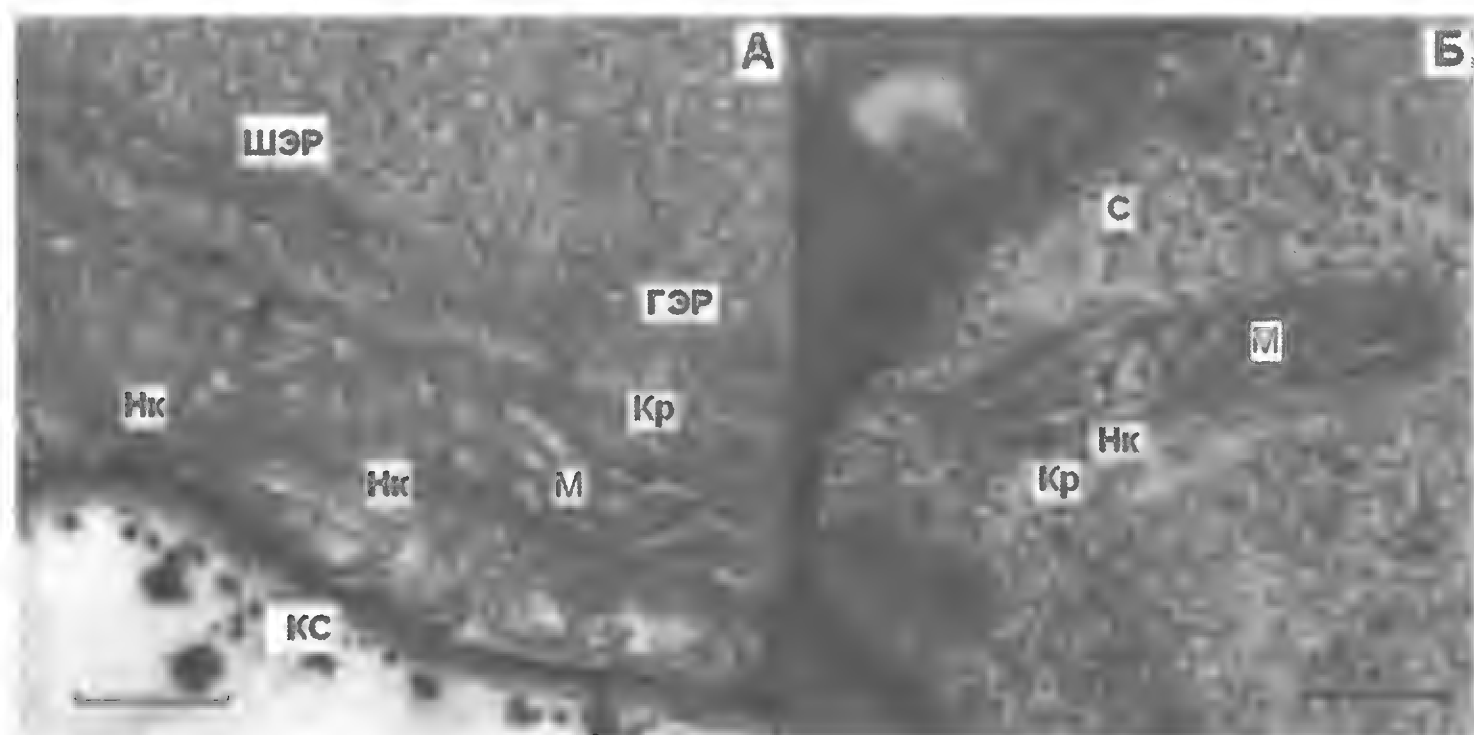


Рис. 79. Митохондрии в мицелии (А) и субгимении (Б) *Agaricus bisporus*. Обозначения: ГЭР — гладкий эндоплазматический ретикулум, Кр — кристы митохондрий, КС — клеточная стенка, М — митохондрия, Нк — нуклеоид митохондрии, С — септа, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум. ТЭМ. Масштабный отрезок 200 нм.

дрожжей *S. cerevisiae* и у мицелиальных базидиомицетов *Agaricus bisporus* и *Pleurotus pulmonarius*. Рибосомы митохондрий по своим свойствам отличны от рибосом цитоплазмы. Так, у дрожжей синтез белка на митохондриальных рибосомах подавляется противобактериальными антибиотиками (например, эритромицином), к которым клетки дрожжей устойчивы.

Наружная мембрана митохондрий содержит белки-порины, гомологичные бактериальным, и проницаема для небольших молекул. Содержание белков в мембранах митохондрий — до 80%. Внутренняя мембрана энергизована и практически непроницаема для ионов и органических молекул. На ее долю приходится более 90% всех митохондриальных липидов. Внутренняя митохондриальная мембрана способна в зависимости от напряженности энергетического обмена образовывать большее или меньшее число складок — *крист*, которые увеличивают ее активную поверхность. Транспорт через внутреннюю мембрану осуществляется белками-переносчиками (транспортерами) или через специальные каналы.

В то время как большинство митохондриальных белков кодируется в ядре и посттрансляционно импортируется в органеллу, небольшая часть белков кодируется митохондриальным геномом (например, часть субъединиц цитохромоксидазы). Митохондрии не могут быть синтезированы *de novo*, они размножаются делением. У многих эукариотических типов клеток митохондрии двигаются вдоль цитоскелетных путей и часто сливаются и делятся. Динамика изменения морфологии митохондрий позволяет адаптировать их активность к потребностям клеток.

Из имеющихся данных по определению нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов был сделан вывод о *монофилетическом* (то есть от одного предка) происхождении митохондрий. Митохондрии, по современным данным, произошли в результате эндосимбиоза от древних пурпурных фотосинтетических грамотрицательных бактерий. Некоторые авторы, правда, выводят митохондрии от другого предка - риккетсий Эти патогенные микроорганизмы содержат ферменты цикла Кребса и электрон-транспортной цепи, но не содержат ферментов гликолиза, что роднит их с митохондриями. Кроме того, они содержат гены белков-транслокаторов (переносчиков через мембрану) адениновых нуклеотидов, что позволяет им использовать АДФ и АТФ клетки-хозяина для своих нужд. Предшественниками клетки-хозяина (эукариотической клетки) могли быть при этом организмы, родственные архебактериям. Они имеют генетическую систему, сходную в некоторых чертах с эукариотической В них присутствуют, например, *интроны* — нуклеотидные последовательности, которые вырезаются в процессе *сплайсинга* (созревания матричной РНК).

8.2. Морфология и динамика митохондрий (слияние и деление)

Совокупность митохондрий в клетке называют хондриом. Митохондрии представляют собой мелкие (длина 0,5–3 мкм, редко до 25 мкм и толщина до 0,5 мкм) внутриклеточные гранулярные или нитевидные, иногда ветвящиеся образования.

В анаэробных условиях митохондрии грибов присутствуют в виде маленьких двумембранных органелл с редуцированными кристами, называемых «промитохондриями». В аэробных условиях, когда окислительное фосфорилирование является основным источником АТФ, митохондрии становятся крупнее и длиннее и локализованы по периферии клетки. Локализация митохондрий обусловлена близостью к возможным местам нахождения кислорода, а нитевидная форма облегчает быструю передачу энергии по клетке.

Размеры и форма митохондрий изменяются в соответствии с фазой жизненного цикла, условиями роста гриба, штаммовыми особенностями и другими факторами. Они могут активно делиться и разветвляться, сливаться или уменьшаться в размере, то есть являются чрезвычайно динамичными органеллами.

Динамично протекающие процессы слияния и деления (динамика) митохондрий обеспечивают лабильность хондриома и регуляцию функций органелл за счет механизмов генетического контроля структуры и функционирования митохондрий в соответствии с потребностями клетки в АТФ.

При изучении почкующихся дрожжей было продемонстрировано, что ядерные и митохондриальные деления имеют четкую корреляцию, конец делений митохондрий приходится на середину S-стадии интерфазы. Распределение митохондрий между материнской и дочерней клетками происходит в течение фаз S и G_2 стадии интерфазы, в результате около половины митохондрий наследуется дочерней клеткой (рис. 80). В клетках *S. cerevisiae* в логарифмической фазе роста наблюдается одна-три митохондрии (рис. 81). В стационарной фазе роста в гаплоидных клетках *S. cerevisiae* можно наблюдать до 50 отдельных органелл.

При половом цикле размножения у *S. cerevisiae* наблюдается следующая динамика поведения хондриома. После слияния гаплоидных клеток происходит слияние отдельных митохондрий в одну гигантскую ветвящуюся структуру, это сопровождается объединением нуклеоидов отдельных митохондрий. Единая сеть сохраняется до конца второго деления мейоза, далее происходит деление хондриома на фрагменты. Четыре наиболее крупных фрагмента в виде колец локализованы в зоне четырех гаплоидных ядер. В процессе формирования аскоспор они распадаются на несколько десятков мелких структур. Таким образом, у *S. cerevisiae* митохондриальный цикл находится в прямой зависимости от клеточного цикла (интерфаза, митоз) и жизненного цикла (неполовое и половое размножение).

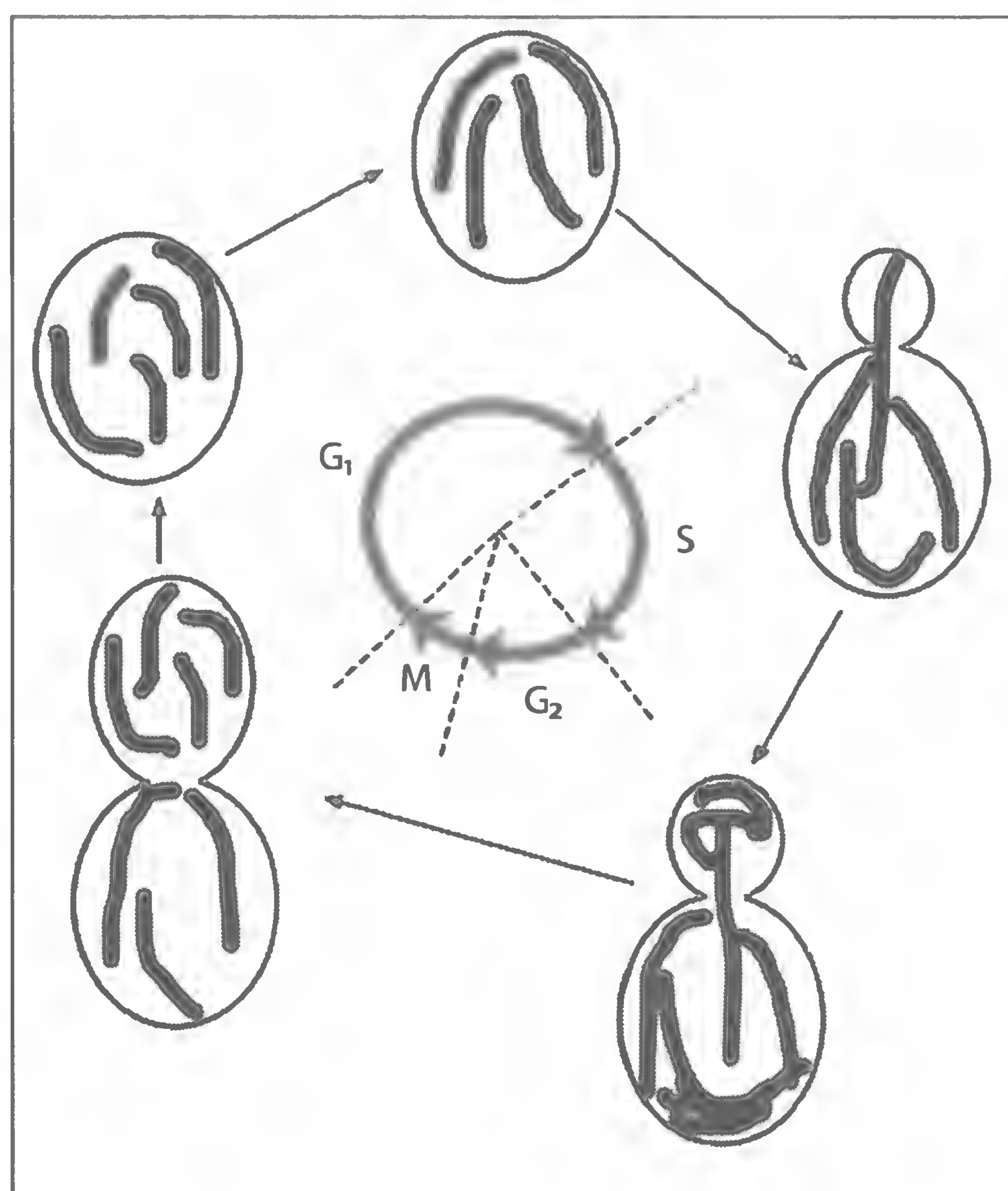


Рис. 80. Распределение митохондрий в ходе клеточного цикла *Saccharomyces cerevisiae* (по: Boldogh et al., 2001, с изменениями). Обозначения: G_1, S, G_2 — стадии интерфазы, М — митоз.

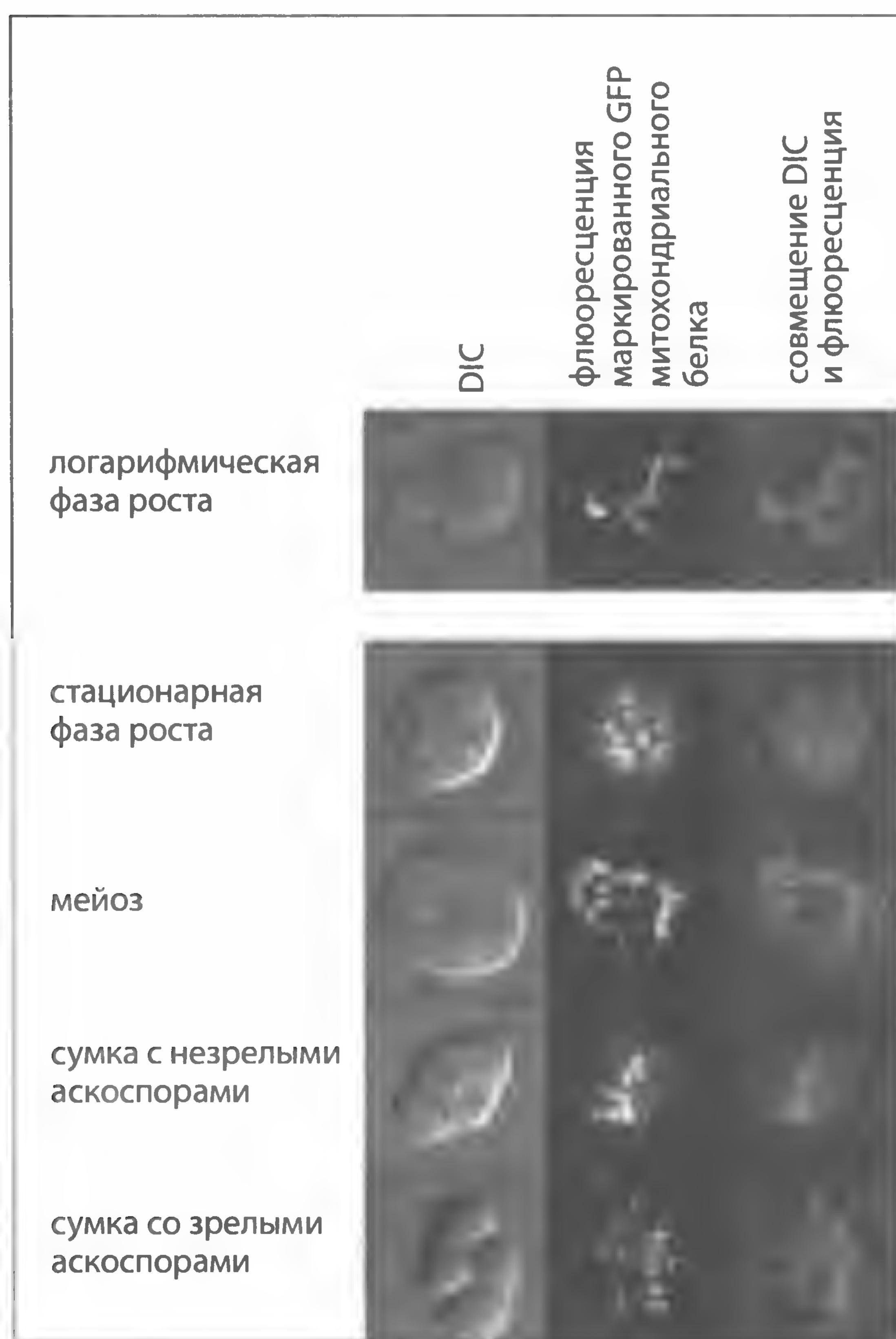


Рис. 81. Морфология и распределение митохондрий, меченных GFP, у *Saccharomyces cerevisiae*. Масштабный отрезок 2 мкм (Dürr et al., 2006).

У мицелиальных грибов митохондрии представляют собой органеллы, распределенные по всему цитозолю и ориентированные в направлении роста гифы.

Количество митохондрий в клетках мицелиальных грибов достигает нескольких десятков, но не тысячи, как в клетках растений. Число митохондрий на клетку зависит от фазы роста, стадии клеточного цикла для апикальных клеток, условий культивирования и др.

У мицелиальных базидиомицетов (виды рода *Agaricus*, *Pleurotus*) в апикальных клетках растущего мицелия с активно делящимися ядрами наблюдается большое число мелких округлых митохондрий. В неделящихся клетках мицелия митохондрии собираются в несколько нитевидных структур, а в удаленных от апекса клетках мицелия хондриом представлен многочисленными мелкими зернистыми митохондриями. В неблагоприятных для роста условиях (повышенная температура, голодание и т.д.) все клетки мицелия имеют мелкие зернистые, как правило, деполяризованные митохондрии.

Механизмы слияния и деления митохондрий хорошо рассмотрены в обзоре Физиковой (2011). Основными компонентами слияния и деления митохондрий являются мембранные белки Mmm1 (белок ЭР), Mdm10, Mdm12 и Mmm2, образующие структуру мембранного *митохора*. Митохор связывает митохондрии и мтДНК с цитоскелетом (у дрожжей с актиновыми тяжами), что обеспечивает контролируемое передвижение органелл и их ДНК в клетке. Для образования трубчатых структур митохондрий и наследования мтДНК необходимы также белки внутренней мембраны митохондрий — Mdm31 и Mdm32, которые взаимодействуют с комплексом мембранного митохора через Mmm1p. Делеции *MDM10*, *MDM12*, *MMM1* и *MMM2* летальны на фоне делеций генов *MDM31* и *MDM32*. Делеции генов *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* или *MMM2* приводят к характерному изменению морфологии органелл — образованию гигантских круглых деполяризованных митохондрий.

Предложено несколько моделей, объясняющих деление митохондрий с участием белков Dnm1, Fis1, Mdv1, Caf4 и Mdm33 (рис. 82). Первым идентифицированным белком-регулятором деления митохондрий стал динаминоподобный белок с ГТФ-азной активностью Dnm1. Делеции гена *DNM1* приводят к образованию сложной сети неразделенных митохондрий. Сходным фенотипом обладают и штаммы с делецией гена *FIS1*, кодирующего интегральный белок наружной мембраны митохондрий. Штаммы с делециями *MDV1*, *CAF4* или *MDM33* имеют измененную структуру митохондрий с нарушенным разделением и наследованием органелл. Белок Fis1p выполняет две функции в

делении митохондрий. На начальной стадии деления Fis1p является мишенью для привлечения Dnm1p к мембране митохондрий и регулирует его сборку. Позднее Fis1p выполняет роль в ограничении скорости деления митохондрий. Белки Mdv1 и Caf4 имеют доменную организацию и выполняют функцию адапторов, связывающих Dnm1 с Fis1. Домен Mdv1p WD облегчает взаимодействие с собранным Dnm1p. Белок Dnm1p обеспечивает образование перетяжки и физическое разделение мембран митохондрий при делении. Mdm33 содержит несколько прогнозируемых спирально закрученных районов в матриксе митохондрий и контролирует морфологию митохондрий у дрожжей. Теоретически возможно два пути слияния митохондрий: с одновременным и раздельным слиянием внутренних и внешних мембран. С практической точки зрения этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях. Механизм слияния внутренней мембраны митохондрий на данный момент представляет собой загадку. Наиболее вероятным участником этого процесса представляется динаминоподобный белок, но как именно он участвует в слиянии митохондрий, на данный момент неизвестно.

Основными регуляторами слияния митохондрий у дрожжей являются ГТФазы наружной и внутренней мембран митохондрий Fzo1 и Mgm1 соответственно, а также белок наружной мембраны Ugo1 (рис. 83). Белок Mgm1 присутствует в клетке в двух формах: полноразмерный белок интегрирован в мембрану митохондрий, а укороченная форма только связывается с внутренней мембраной. «Длинная» форма белка участвует как в слиянии органелл, так и в формировании трубчатых митохондрий. При этом только «укороченная» форма Mgm1p может взаимодействовать с Ugo1p и Fzo1p. Образование укороченной формы Mgm1p происходит за счет действия протеазного комплекса внутренней мембраны Pcp1p/ Rbd1p/ Ugo2p. Процессинг Mgm1p зависит от мембранного потенциала (МП) митохондрий. Следовательно, на этом уровне морфология органеллы и развитие крист внутренней мембраны могут регулироваться энергетическим состоянием клетки.

Процесс слияния митохондрий (рис. 83) имеет большое значение для наследования и сохранения генома митохондрий. Не случайно перед митозом или мейозом ядра происходит слияние мелких митохондрий в одну или несколько крупных митохондрий. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, мутантных в слиянии митохондрий, быстро утрачивают мтДНК и теряют способность к дыханию. Процесс слияния митохондрий можно разделить на три этапа — фиксация органелл, слияние наружных и слияние внутренних мембран органелл. За осуществление первого этапа отвечает белок Fzo1, который фиксирует две митохондрии друг относительно друга с помощью биспиральных (coiled-coil) доменов. В месте контакта происходит соприкосновение наружной и внутренней мембран митохондрий в результате связывания белков Fzo1 и Mgm1 белком Ugo1. Слияние мембран зависит от присутствия ГТФ. Белок Mdm30p контролирует содержание Fzo1p в наружной мембране. Комплексы инактивированных белков Fzo1 отправляются на убиквитин-зависимую протеолитическую деградацию. Мутации гена, кодирующего необходимую для протеолиза субъединицу протеосомы Rpn1p, приводят к фрагментации митохондрий, что, возможно, происходит за счет нарушения деградации Fzo1p.

Структурную и функциональную организацию митохондрий во многом определяет белковый состав ее мембран. Отличительная особенность внешней митохондриальной мембраны - содержание большого количества белка порина, образующего поры в мембране. Благодаря порину внешняя мембрана свободно проницаема для неорганических ионов, метаболитов и даже небольших молекул белков (меньше 10 кДа). Для больших белков внешняя мембрана непроницаема, это позволяет митохондриям удерживать белки межмембранного пространства от утечки в цитозоль. Для внутренней мембраны митохондрий характерно высокое содержание белков, около 70%, которые выполняют в основном каталитическую и транспортную функции. Транслоказы мембраны обеспечивают избирательный перенос веществ из межмембранного пространства в матрикс и в обратном направлении, ферменты участвуют в транспорте электронов (цепи переноса электронов) и синтезе АТФ.

8.3. Движение и наследование митохондрий между материнской и дочерней клетками

Ранее полагали, что движение митохондрий, а также изменение конформации в зависимости от энергетического состояния, пассивно регулируются содержанием ионов и воды в матриксе. Однако обнаружение актина в митохондриях дрожжей дает основание полагать, что за подвижность митохондрий у грибов отвечает цитоскелет.

Актин-зависимый и тубулин-зависимый транспорт митохондрий.

Так, в клетках *Saccharomyces cerevisiae,* как и в клетках *Aspergillus nidulans*, в транспорте митохондрий большую роль играют актиновые тяжи. У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, мицелиального аскомицета *Neurospora crassa* и в клетках млекопитающих, наоборот, в распределении митохондрий задействованы, в основном, микротрубочки.

Микротрубочко-зависимый транспорт митохондрий был подробно изучен в клетках *N. crassa.* Движение митохондрий у *N. crassa* происходит со скоростью 1,4 мкм/с в клетках гиф, протопластов, клеток с нарушением синтеза клеточной стенки. Разрушение микротрубочек с помощью нокодазола уменьшало подвижность митохондрий, в то время как разрушение микрофиламентов цитохалазином D не оказывало такого влияния. Показано участие периферических белков митохондрий в связывании с микротрубочками. К таким белкам относятся белки из семейства кинезинов или родственного динеину белка. Роль связанных с кинезином белков в движении митохондрий была изучена на клетках животных. Биохимические исследования показали, что посредниками, осуществляющими связывание митохондрий с микротрубочками, являются аденин-нуклеотид-зависимые белки, находящиеся на поверхности органеллы.

При делении клеток почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* митохондрии используют актиновый цитоскелет и для антероградного, и для ретроградного передвижения. Если ретроградный транспорт к материнской клетке осуществляется пассивно, то для антероградного транспорта к почке требуется энергия для преодоления ретроградного потока. Для обеспечения энергией процесса транспорта таких мембранных органелл, как пероксисомы, вакуоли, везикулы аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, используются моторные белки Myo2. Для обеспечения антероградного транспорта митохондрий необходимо участие нескольких моторных белков — Myo2, комплекса Arp2/3 и Rho-ГТФазы Gem1. В отличие от всех остальных моторных белков комплекс Arp2/3 определяет подвижность органеллы, а не направленность ее транспорта. Направленность транспорта обеспечивает присоединение митохондрий к актиновому цитоскелету через моторный комплекс Myo2p/Myo4p и мембранный митохор посредством белка Puf3.

Митохондрии не могут быть синтезированы *de novo* и передаются от материнской клетки дочерней, поэтому особое значение приобретают механизмы равномерного распределения и наследования в ходе клеточного цикла как самих органелл, так и их генетического материала. Ключевую роль в наследовании митохондрий играет цитоскелет. Этот процесс еще слабо изучен у мицелиальных грибов, но неплохо исследован у почкующихся дрожжей.

Наследование митохондрий аналогично пероксисомам и может рассматриваться как баланс между процессом, который обеспечивает поддержание популяции митохондрий в материнской клетке, и процессом переноса оставшейся части митохондрий в дочернюю клетку. Клетки должны координировать это перетягивание каната из органелл для достижения успешного наследования. И в этом процессе помимо филаментов актина участвует важный белок митохондрий Mmr1, который является рецептором миозина Myo2. Наблюдения над клетками почкующихся дрожжей показали, что в распределении митохондрий ключевую роль играет кортикальный белок Num1, который образует физический контакт с митохондриальным белком Mdm36, обеспечивая связь с кортексом и кортикальным ЭР.

8.4. Геном митохондрий

ДНК в митохондриях представлена циклическими или линейными молекулами, не образующими связь с гистонными белками. Митохондриальная ДНК (мтДНК или нуклеоид/хромосома) занимает отдельную зону митохондриального матрикса (рис. 79). В митохондриях грибов может быть от 20 до 50 нуклеоидов. Митохондриальная ДНК однородна, отли-

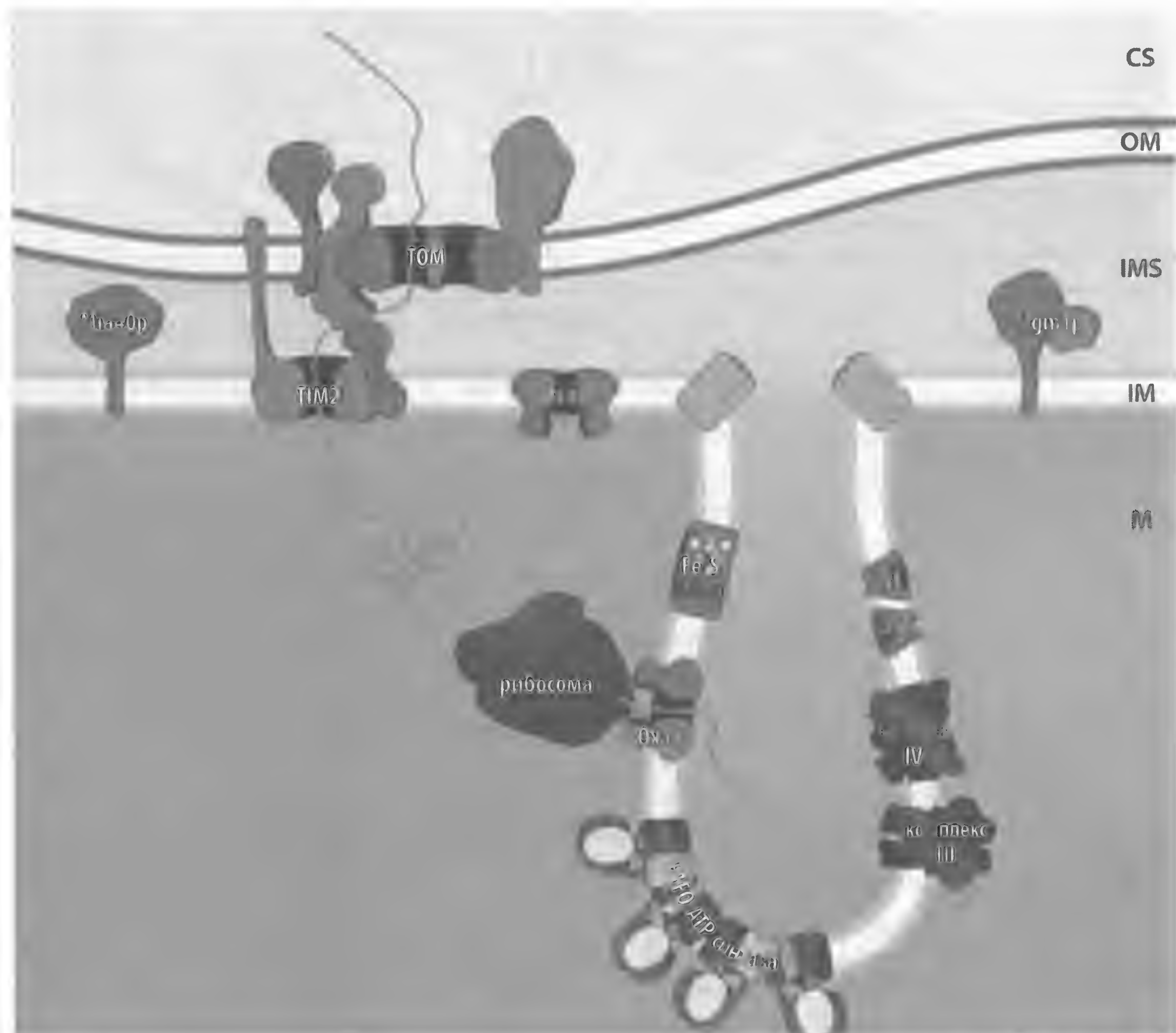


Рис. 84. Субкомпартментализация внутренней митохондриальной мембраны. Распределение митохондриальных белков, участвующих в нескольких главных процессах митохондрий, определено методом количественной иммуноэлектронной микроскопии у *Saccharomyces cerevisiae*. Белки внутренней мембраны, участвующие в слиянии митохондрий (Mgm1p) или транслокации белков (Mia40p, комплекс TIM23), локализованы на участке мембраны, не участвующем в формировании крист. В противовес этому белки, участвующие в окислительном фосфорилировании (ANC, Комплекс III, Комплекс IV, F1FO-ATP-синтаза) и в Fe/S кластере, сконцентрированы в мембране крист. Обозначения: CS — цитозоль; OM — наружная мембрана; IMS — межмембранное пространство; IM — внутренняя мембрана; M — матрикс (Zick et al., 2009).

чия заключаются в величине интронов и нетранскрибируемых участков. В мтДНК имеется стандартный набор генов: ферментов дыхательной цепи, участвующих в процессах окислительного фосфорилирования, гены рРНК, тРНК и гены АТФаз. Синтез митохондриальной ДНК не связан с синтезом ДНК в ядре.

К настоящему времени проведено полное секвенирование митохондриальной ДНК дрожжей (делящиеся и почкующиеся дрожжи) и ряда мицелиальных грибов. Показано, что у разных грибов в составе мтДНК обычно содержится от 5 до 100 генов с типичным ядром митохондриального генома, содержащим 14 консервативных генов, кодирующих белки, 2 гена рРНК и разное количество генов тРНК. В зависимости от вида организма порядок генов в геномах митохондрий отличается. Несмотря на то, что в геномах митохондрий млекопитающих и дрожжей содержится приблизительно одинаковое количество генов, размеры дрожжевого генома в 4–5 раз больше — около 80 тыс. пар нуклеотидов, у *Podospora anserina* — 100 тыс. пар нуклеотидов. Размер генома митохондрий грибов от 18 до 175 кбайт (*S. pombe* и *Agaricus bitorquis* соответственно) промежуточный между митохондриальным геномом животных (примерно 16 кбайт) и растений (130–350 кбайт).

В отличие от позвоночных животных у растений, грибов и простейших мтДНК содержит до 80% некодирующих последовательностей (интронов). Хотя кодирующие последовательности мтДНК дрожжей высоко гомологичны соответствующим последовательностям у человека, дрожжевые мРНК дополнительно имеют 5'-лидерную и 3'-некодирующую области, как и большинство ядерных мРНК.

Сохранение целостности митохондриального генома в процессе наследования очень важно для дыхательной функции. Факторы, контролирующие сегрегацию митохондриального генома, мало изучены.

Для большинства высших эукариотических организмов (животные, многие растения, простейшие и многие грибы) характерно однородительское наследование мтДНК, то есть после скрещивания двух родительских клеток у потомства сохраняется мтДНК только одного из родителей. Такое наследование установлено для мицелиальных грибов из Ascomycota *Neurospora tetrasperma*, *N. crassa* и Basidiomycota (*Coprinopsis cinerea*). Как в случае слияния специализированных половых клеток (архикарпа и конидии), так и при слиянии гомокариотических клеток вегетативного мицелия, отличающихся по ядрам с разными mat-локусами, сохраняются митохондрии клеток акцепторов ядер. В то же время для почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* характерно двуродительское наследование.

8.5. Дыхательная цепь митохондрий

Общие сведения

Дыхательная электрон-транспортная цепь локализована на внутренней мембране митохондрий (рис. 84) и обеспечивает направленный перенос электронов от НАДН (который поступает из цикла Кребса, см. главу «Метаболизм») на молекулярный кислород через цепь переносчиков по градиенту, от соединений с более отрицательным потенциалом к соединениям с более положительным редокс-потенциалом. Для большинства организмов во внутренней мембране митохондрий идентифицировано четыре белковых комплекса, обеспечивающих транспорт электронов на кислород, и пятый комплекс АТФ-синтаза, который участвует только в переносе протонов:

I — НАДН-дегидрогеназа

II — сукцинатдегидрогеназа

III — убихинол:цитохром *c*-редуктаза

IV — цитохром *c*-оксидаза

V — Н+-транспортирующая АТФ-синтаза.



Рис. 85. Суммарная схема базовых комплексов электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий у грибов. I, II, III, IV — основные электрон-транспорные комплексы; ex — наружная НАДН:убихинон оксидоредуктаза; in — внутренняя НАДН:убихинон оксидоредуктаза; UBQ — пул убихинон:убихинол; c — периферический цитохром *c*; AO — альтернативная оксидаза Стрелки показывают направление потока электронов (Joseph-Horne et al., 2001).

Комплексы дыхательной цепи построены из множества полипептидов и содержат ряд различных окислительно-восстановительных коферментов, связанных с белками. К ним принадлежат флавин (ФМН (FMN) или ФАД (FAD) в комплексах I и II), железо-серные центры (в I, II и III) и группы *гемов* (комплексные соединения порфиринов с двухвалентным железом в II, III и IV). В I, III и IV дыхательных комплексах транспорт электронов сопряжен с переносом протона, в результате чего создается градиент протонов, используемый для синтеза АТФ (*окислительное фосфорилирование*). На каждый комплекс действуют определенные ингибиторы, например, ротенон и пиерицидин на Комплекс I, антимицин и миксотиазол на Комплекс III и цианид на Комплекс IV. У грибов и растений обнаружены также альтернативные пути переноса электронов (альтернативная Комплексу I НАДН: убихинон оксидоре-

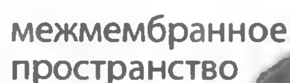


Рис. 86. Альтернативная внутренняя и наружная НАДН-дегидрогеназы дрожжей (NDI1 и NDE1 соответственно) локализованы напротив друг друга на внутренней мембране митохондрий. Обозначения: UBQ - - убихинон, $UBQH_2$ — восстановленная форма убихинона (Joseph-Horne et al., 2001).

дуктаза и Комплексу IV — альтернативная оксидаза), которые нечувствительны к действию ингибиторов Комплекса I и IV. Схемы стандартных и альтернативных компонентов дыхательной цепи у грибов представлены на рис. 85, 86.

Несколько десятилетий назад, когда дыхательные белковые комплексы митохондрий были только выделены и исследованы, предполагалось, что они существуют в мембране независимо друг от друга и общаются только с помощью путешествующих между ними переносчиков электронов — убихинона и цитохрома *c*. Такое предположение получило название «жидкая модель» (fluid model). Однако постепенно появлялись свидетельства того, что дело обстоит не так просто и дыхательные комплексы, возможно, объединяются между собой в более крупные структуры — «суперкомплексы», обеспечивая разветвленность пути передачи электронов. В 2000 г. была высказана смелая гипотеза — ее назвали «цельная модель» (solid model), — согласно которой комплексы I, III и IV объединяются вместе в один гигантский суперкомплекс под названием респирасома (respirasome), в результате чего они работают более слаженно. У дрожжей обнаружены два белка, Rcf1 и Rcf2, которые участвуют в образовании суперкомплексов.

8.5.1. Дыхательные комплексы основного электрон-транспортного пути у грибов

8.5.1.1. Комплекс I

Комплекс I обеспечивает сопряженный перенос электронов от НАДН на убихинон одновременно с перемещением протонов из матрикса митохондрий через внутреннюю мембрану митохондрий в межмебранное пространство. Комплекс I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза) был выделен из ряда объектов: митохондрий сердца быка, митохондрий сахарной свеклы, картофеля, бобов, арабидопсиса, риса, а также митохондрий ряда грибов и мембран *Escherichia coli*, однако не найден у дрожжей *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* и *Kluyveromyces lactis*. У грибов Комплекс I был исследован в основном на примере *N. crassa*, включая определение его структуры; многое известно о Комплексе I и у *Aspergillus niger*. По-видимому, Комплекс I у грибов похож на его аналоги у других форм жизни. Число субъединиц белка равно 35, из которых только 7 кодируются митохондриальным геномом. Как и у других эукариот, этот комплекс формирует L-образную структуру с редокс-центрами, напоминающую башмак. Субъединицы, связанные с окислением НАДН (ФМН, FeS центры), локализованы в периферической, обращенной к матриксу, гидрофильной части комплекса, в то время как субъединицы, участвующие в переносе протона и связывающие убихинон, локализованы в гидрофобной части и погружены в мембрану. В результате функционирования Комплекса I электроны с НАДН передаются на ФМН, после чего через цепь FeS-кластеров доходят до убихинона. Убихинон также является акцептором электронов в реакции окисления сукцината до фумарата, которую катализирует комплекс II дыхательной цепи.

8.5.1.2. Комплекс II

Комплекс II (сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза) функционирует как часть цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и как компонент дыхательной цепи. Комплекс был выделен из митохондрий растений (картофеля, батата, маша), а также из объектов животного происхождения, грибов и бактерий. Комплекс II включает в себя четыре крупных полипептида, которые у дрожжей кодируются ядерными генами *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* и *SDH4*, ФАД, три кластера FeS (2Fe-2S, 3Fe-4S и 4Fe-4S) и гем b-типа. Роль цитохрома *b* охарактеризована слабо. Главные`каталитические группы (ФАД и FeS) локализованы в белках Sdh1p и Sdh2p. Электроны, отнимаемые от сукцината, переносятся сначала на ФАД, а затем через Fe-S-кластеры на убихинон (Q). Хотя Комплекс II захватывает мембрану, он не переносит

протоны и не вносит вклад в энергизацию мембраны, то есть работает только, как переносчик e^- от сукцината к убихинону (Q). Другие два пептида обеспечивают заякоривание комплекса II в мембране и включают места связывания гуанина, а также лигандов для гема *b*-типа. Причем, если каталитические пептиды сохраняют высокую степень гомологии на уровне последовательности аминокислот среди митохондрий и бактерий, то среди маленьких заякоривающих пептидов наблюдаются значительные вариации. Сукцинат дегидрогеназа (SDH) *S. cerevisiae* также содержит цитохром *b*-типа.

8.5.1.3. Комплекс III

Комплекс III (*bc1* комплекс; убихинол:цитохором *c* оксидоредуктаза) лучше всего охарактеризован среди главных дыхательных компонентов и обнаружен в митохондриях из разных источников (митохондрии кролика, цыпленка, сердца быка и дрожжей). Общий механизм показывает замечательную консервативность функционирования комплекса не только в митохондриях эукариот, но и у прокариот. Для грибов кристаллическая структура Комплекса III получена и исследована у дрожжей *S. cerevisiae* и *N. crassa*. Комплекс *bc1* *S. cerevisiae* содержит 10 субъединиц, из которых только пептид цитохрома *b* кодируется митохондриальным геномом.

В Комплексе III дрожжей, как и во всех других исследованных к настоящему времени комплексах *bc1*, в сохранение энергии вовлечено четыре редокс центра. Они локализованы в трех субъединицах: цитохроме *b*, заякоренном в мембране белке Риске с железосерными кластерами FeS и цитохроме *c1* (также заякоренном в мембране). Пептид цитохрома *b* состоит из восьми трансмембранных спиралей с двумя гемами, b_H (высокопотенциальный) and b_L (низкопотенциальный), локализованными между спиралями B и D. Гем b_L расположен ближе к межмембранному пространству, а b_H — ближе к матриксу. Вокруг металлопротеинового ядра комплекса расположены оставшиеся субъединицы, которые включают два сердцевинных белка, обращенных к матриксу, COR1 и QCR2. Эти две субъединицы показывают гомологию с митохондриальными пептидазами, участвующими в обработке новых импортируемых в митохондрии белков. Однако в отличие от своих эквивалентов в бычьих митохондриях дрожжевые субъединицы протеолитически неактивны и не участвуют в цитохром *c* - редуктазной активности. Тем не менее, дефекты в любом из этих основных белков препятствуют правильной сборке комплекса *bc1* у дрожжей.

Редокс-реакции убихинола сопряжены с серией последовательных событий протонирования и депротонирования, которые протекают в двух разных местах: Qout и Qin. Место Qout расположено вблизи внешней (out) стороны внутренней мембраны митохондрий, обращенной к межмембранному пространству (P-сайт), а участок Qin находится вблизи внутренней (in) стороны мембраны, контактирующей с матриксом (N-сайт). В участке Qout связывается убихинол (UQH_2 восстановленная форма коэнзима Q), а Qin предназначен для связывания окисленной формы убихинона (UQ). Окисление хинола происходит через бифуркационную реакцию, инициированную в этом месте потерей одного электрона, который переносится вдоль цепи с высоким потенциалом на 2Fe-2S-центр белка Риске. Изучение кристаллической структуры комплекса показало, что позиция 2Fe-2S-центра относительно других редокс-центров может смещаться. Оказалось, что белок Риске имеет подвижный домен, на котором собственно и расположен 2Fe-2S-центр. Принимая электрон и восстанавливаясь, 2Fe-2S-центр меняет свое положение, отдаляясь от Qout-центра и гема b_L и тем самым приближаясь к цитохрому *c1*; отдав электрон цитохрому, 2Fe-2S-центр, наоборот, сближается с Qout-центром для установления более тесного контакта. Таким образом, функционирует своеобразный челнок, гарантирующий уход второго электрона на гемы b_L и b_H.

Транспорт электронов в комплексе организован следующим образом: две молекулы UQH_2 окисляются в P-сайте, высвобождая в межмембранное пространство по два протона

на каждую молекулу; один электрон от каждой молекулы UQH_2 идет на 2Fe-2S-центр белка Риске и далее на цитохром *c1* и цитохром *c*, а второй — на расположенную в N-сайте молекулу UQ через гемы цитохрома *b*. Расположение этих гемов в комплексе перпендикулярно плоскости мембраны, в результате чего электрон пересекает мембрану в направлении к Qin-центру. В этом центре уже связан окисленный Q (UQ), который восстанавливается с образованием QH_2. При этом 2H+ захватываются из матрикса. Восстановленный UQH_2 покидает Qin-центр, уходит в мембранный пул и может быть вновь окислен в Qout-центре комплекса. Таким образом, при окислении двух UQH_2 в Qout-центре каждый раз $2H^+$ уходят в межмембранное пространство. Из $4e^-$, отданных в комплекс, $2e^-$ идут на восстановление цитохрома *c*, т.е. уходят по цепи, а два других последовательно восстанавливают UQ до UQH_2 в Qin-центре, что сопровождается захватом из матрикса еще $2H^+$. Принимая последовательно два электрона от двух молекул UQH_2 и два протона, одна молекула UQ восстанавливается, при этом промежуточным интермедиатом является убисемихинон анион-радикал.

Восстановление убихинона до убихинола на участке Qin сопряжено с закачкой протонов из матрикса митохондрий. Как и в случае с освобождением протонов на участке Qout, точные механизмы этих процессов остаются неизвестными. Субъединицы комплекса дрожжей более жестко связаны, что защищает их от диссоциации.

Механизм восстановления и окисления цитохрома *c1* еще не полностью определен. Несмотря на сложность процесса, результирующая реакция проста и отражает перенос электронов с убихинола на цитохром *c1* и транспорт протонов через мембрану. С цитохрома *c1* электрон передается на цитохром *c*, который восстанавливает цитохромоксидазу.

Недавно грибной комплекс *bc1* приобрел важное значение для фитопатологов как мишень для действия фунгицидов. Получили развитие два класса коммерческих ингибиторов, полученных на основе метоксиакрилата (methoxyacrylate) и оксазолидинона (oxazolidinone), такие как азоксистробин (azoxystrobin) и фамоксадон (famoxadone). Оба компонента блокируют перенос электронов к участку Qout. Класс метоксиакрилатов был разработан из стробилурина А, который образуется грибом *Strobilurus tenacellus*. Исследование действия нескольких ингибиторов на образующих их видах грибов обнаружило, что имеется иммунитет к своему собственному ингибитору. Комплекс *bc1 S. tenacellus* очень похож на аналогичный у *S. cerevisiae* относительно состава субъединиц, спектральных характеристик; у него наблюдали замену Pro254 (или Ser254, обнаруженного у многих грибов) на Gln и замену Asn261 на Asp.

8.5.1.4. Комплекс IV

Комплекс IV (цитохром *c* оксидаза, терминальная оксидаза основной дыхательной цепи) — это последний комплекс дыхательной цепи, передающий электроны от цитохрома *c* на молекулярный кислород, который восстанавливается до H_2O. Он относится к гем-сопряженному семейству оксидаз, в котором каталитический цикл сопряжен с переносом протона с общепринятой стехиометрией — два протона приходятся на два электрона. Кристаллические структуры были недавно получены для комплексов из митохондрий сердца быка и бактерии *Paracoccus denitrificans*. Комплекс из митохондрий быка (мол. масса ~ 125 кДа) состоит из 13 белковых субъединиц и проявляет наибольшую активность в форме димера. Три большие трансмембранные субъединицы кодируются митохондриальной ДНК и окружены 9–10 более мелкими, синтез которых контролируется ядерными генами. Функциональное ядро содержит четыре редокс-центра: два гема а-типа (гем *a* и гем a_3) и два атома меди (CuA и CuB). Редокс-центры комплекса расположены на двух крупных субъединицах I и II, интегрально встроенных в мембрану.

Анализ аминокислотных последовательностей для каждой субъединицы Комплекса IV у *S. cerevisiae* выявил высокое сходство с аналогами из митохондрий сердца быка. Биохимические и кристаллографические исследования Комплекса IV показали, что субъединица II (26 кДа) содержит CuA-центр, состоящий из двух ионов Cu в комплексе с –SH группами двух Cys, а субъединица I (57 кДа) содержит остальные редокс-центры, как-то: две группы гемов а и a_3 и CuB-центр. Гем a_3 и CuB формируют второй двуядерный центр, который принимает электроны с гема а и передает их на кислород. Таким образом, электрон с цитохрома *c* передается на CuA-центр, далее на гем *a*, а после на гем a_3-CuB-центр. С CuB-a_3-центра электрон переносится на кислород.

Дрожжи *S. cerevisiae* оказались полезными для направленного мутагенеза по Комплексу IV и для выяснения критических этапов сопряженного переноса протона. Пока не совсем ясно, как происходит перенос протона, но показано участие двух гидрофильных каналов, в которых критичными являются аминокислоты Asp и Lys. Протоны входят из матрикса в межмембранное пространство через эти каналы и используются в процессе восстановления кислорода до воды. Для каталитической активности комплекса оба эти канала должны быть функциональными. Однако точный механизм переноса протонов остается неясным.

Информация по структуре и функционированию Комплекса IV, как и других комплексов дыхательной цепи, в основном ограничена дрожжами *S. cerevisiae.* Цианид только частично ингибирует потребление кислорода митохондриями дрожжей.

8.5.2. Альтернативная НАДН:убихинон оксидоредуктаза у грибов

Общие сведения

У многих животных Комплекс I является единственным механизмом передачи электронов от НАДН в дыхательную цепь. Как следствие, окисление НАДН полностью ингибируется ротеноном и пиерицидином. Кроме того, цитоплазматический НАДН может быть использован только косвенно через малат-аспартатный челночный механизм. В противоположность этому, у грибов, как и у растений, распространен другой комплекс, альтернативный Комплексу I. Он либо непосредственно окисляет цитоплазматический НАДН, либо действует параллельно с Комплексом I, создавая ротенон-нечувствительное окисление внутримитохондриального НАДН.

Известно три класса НАДН:убихинон (UQ) оксидоредуктаз. Комплекс I относится к классу 1, в то время как альтернативная дегидрогеназа митохондрий растений и грибов принадлежит к классу 2. В классе 3, ограниченном бактериями, перенос электрона сопряжен с Na-насосом. Гидрогеназа в классе 2 кодируется одним ядерным геном и представляет собой зрелый белок с молекулярной массой 50–60 кДа. Самое важное функциональное отличие альтернативной дегидрогеназы от Комплекса I заключается в том, что электронный транспорт на UQ не сопряжен с переносом протона.

Внутренняя и наружная НАДН-дегидрогеназы: **белки и их назначение.**

Перед тем как вернуться к грибам, будет полезно обратиться к митохондриям картофеля. Как многие растения, картофель имеет внутреннюю и наружную альтернативные НАДН дегидрогеназы (NDA и NDB соответственно). Сравнительный анализ генов выявил сходство NDA и NDB с дрожжевой NDI1 с идентичностью около 30–40%. Оба белка как NDA, так и NDB имеют НАДН- и ФАД-связывающие мотивы, хотя никто из них не имеет признаков формирования α-спирали в мембране митохондрий. Исследования судьбы синтезированных пептидов показали, что предшественник NDA импортируется в митохондрии с удалением короткого меченого пептида после внедрения. В противоположность этому, предшественник NDB не достигает митохондриального матрикса, несмотря на наличие N-концевой меченой последовательности. Вместо этого, он только пересекает наружную митохондриальную мембрану. Оба белка становятся связанными с внутренней митохонд-

риальной мембраной, но их разные мишени приводят к локализации на противоположных сторонах мембраны. Относительно центрального липидного бислоя они будут всегда зеркальным отражением друг друга, как показано на рис. 85. В этом отношении они уникальны среди митохондриальных белков. Имеются доказательства присутствия внутренней и наружной НАДН-дегидрогеназ у многих видов.

Saccharomyces cerevisiae

Как упоминалось выше, у *S. cerevisiae* отсутствует Комплекс I. Вместо этого, восстановленные эквиваленты доставляются в дыхательную цепь через три НАДН-дегидрогеназы:NDE1, NDE2 (наружные) и NDI1 (внутренняя). Все они нечувствительны к ротенону или перицидину, у них отсутствуют FeS редокс центры и они кодируются в ядре с митохондриальной сигнальной последовательностью на N-конце. Наиболее полная характеристика дана для NDI1. Зрелый белок состоит из одной субъединицы с молекулярной массой 53 kDa, нековалентно связанной с ФАД. Протонный насос у NDI1 отсутствует.

Neurospora crassa

Другой гриб, у которого интенсивно исследуется альтернативная НАДН-дегидрогеназа — это *N. crassa*. Показано нечувствительное к ротенону окисление матриксного и цитоплазматического НАДН, подразумевающее присутствие обеих внутренней и наружной дегидрогеназ класса 2. В отличие от *S. cerevisiae*, Комплекс I у *N. crassa* присутствует.

Недавно получен клон кДНК, кодирующий дегидрогеназу с высокой гомологией по аминокислотам с NDI1, NDE1 и NDE2 *S. cerevisiae*. Гетерологичная экспрессия определила, что он кодирует один пептид с молекулярной массой 64 кДа. Показано, что прогнозируемая последовательность содержит НАДН- и ФАД-связывающие мотивы. Ca_2-связывающий домен был также идентифицирован у *N. crassa*, однако отсутствовал у последовательности из дрожжей. Сходный Ca_2-связующий домен наблюдали у наружной дегидрогеназы из картофеля (NDB; см. выше). Можно предположить, что Ca_2 играет регуляторную роль для обоих белков.

8.5.3. Альтернативная оксидаза у грибов

Альтернативная оксидаза (АО) действует параллельно с комплексом *bc1* для окисления убихинола и также катализирует перенос 4 электронов на кислород и образование воды (рис. 86). В сравнении с другими компонентами дыхательной цепи грибов, понимание ее функций, регуляции и молекулярной организации сравнительно отстает. АО кодируется ядром и обнаружена во многих геномах протестированных грибов за исключением *S. cerevisiae* и *S. pombe*. Для проверки активности АО проводятся измерения потребления кислорода O_2 с помощью электрода Кларка. Такие анализы выявили чувствительность грибной АО к гидроксамовым кислотам (salicylhydroxamic acid (SHAM)) и алкилгаллатам (например, n-пропилгаллат). В то же время цианид, азид, CO и NO (окись азота) не действуют на АО, но все они ингибируют цитохром *c* оксидазу.

Все эти свойства присущи и растительной АО. Один из ключевых вопросов, касающихся грибной АО, является ли ее экспрессия конститутивной. Если это так, то она должна быть активным компонентом электрон-транспортной цепи. Результаты ингибиторного анализа в сочетании с измерением потребления кислорода показали конститутивный, а не индуцированный характер появления АО в митохондриях грибов.

В отличие от компонентов основной дыхательной цепи, грибная АО, по-видимому, имеет сложные механизмы регуляции экспрессии. Ранние исследования выявили, что она экспрессируется только тогда, когда основной путь окисления убихинола заингибирован, например, антимицином или цианидом. Последние результаты, полученные на фитопатогенном грибе *Magnaporthe grisea*, показали, что транскрипция АО конститутивна, а трансляция и активация происходят только в условиях стресса. Стресс может полностью или

частично прекращать поток электронов через основной путь или повышать уровень H_2O_2. Однако миксотиазол (блокируют перенос электронов на сайт Qout Комплекса Ш) имеет слабый эффект на индукцию АО у *Hansenula anomala*. Отсутствие ответа на миксотиазол, вероятно, связано с отсутствием генерации супероксида.

8.6. Митофагия у дрожжей

Окислительное фосфорилирование в митохондриях сопряжено с образованием энергии, которая используется во многих клеточных процессах. С другой стороны, митохондрии — основной источник активных форм кислорода (АФК) в клетке, которые представляют окислительную опасность для митохондриальной ДНК, белков и липидов. Повреждения митохондрий могут вызывать дополнительное формирование активных форм кислорода через дефектную электрон-транспортную цепь. Соответственно, повреждение или излишек митохондрий представляют фактор риска для клетки, и своевременное удаление таких органелл важно для поддержания оптимального клеточного гомеостаза. Показано, что накопление поврежденных и представляющих опасность митохондрий индуцирует *апоптоз* (программируемая гибель клетки) через освобождение цитохрома *c* и коррелирует со старением или развитием основных нейродегенеративных болезней у человека и животных. Последние достижения, полученные на разных эукариотах от дрожжей до млекопитающих, позволили понять, что автофагия — это первичный механизм для устранения дефектных или лишних митохондрий. Если процесс автофагии не способен устранить эти нарушения и восстановить нормальное функционирование жизненно важных процессов в клетке, включается механизм самоуничтожения клетки — апоптоз.

Возможны два способа митофагии у грибов: макроавтофагоподобный (селективный, подробно см. раздел «Автофагия» главы 6) и микроавтофагоподобный (неселективный)

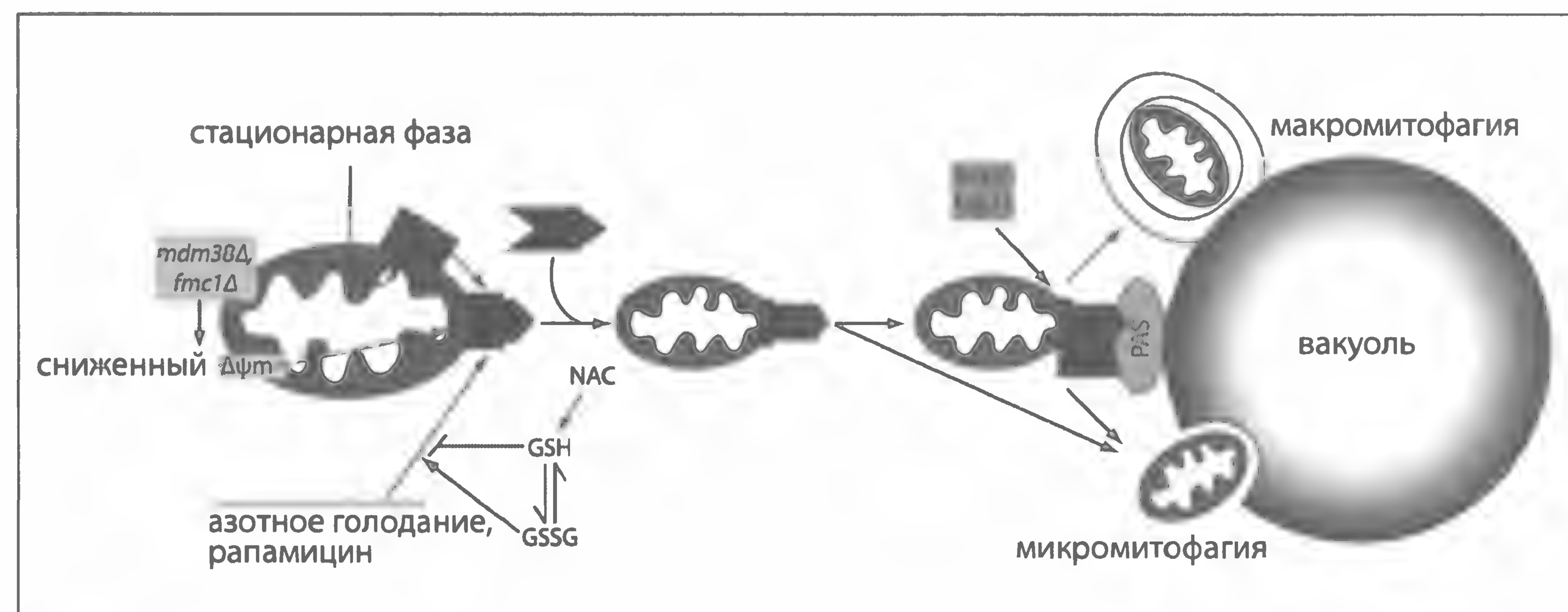


Рис. 87. Схема митофагии у дрожжей. Митофагия индуцируется снижением мембранного митохондриального потенциала, азотным голоданием, рапамицином или входом в стационарную фазу. Снижение пула глутатиона (GSH), образующегося из глутатион-дисульфида (GSSG), ингибирует митофагию. При индукции митофагии митохондриальный рецептор Atg32 связывается с адапторным белком Atg11. Atg11 направляет митохондрии к комплексу PAS (преавтофагосомальная структура), где Atg32 может связываться с Atg8, способствуя формированию фагофора, который окружает митохондрии. Митохондрии могут быть доставлены в вакуоль через макроавтофагоподобный или микроавтофагоподобный механизм (Kanki, Klionsky, 2010).

пути . При индукции митофагии у дрожжей (азотное голодание, вход в стационарную фазу роста) адапторный белок цитоплазмы Atg11 связывается с митохондриальным резидентным белком Atg32. Комплекс Atg11-Atg32 маркирует митохондрии и направляет к сайту PAS (phagophore assembly site) вакуоли. Когда митохондрия достигает PAS, далее в случае макроавтофагоподобной селективной автофагии, она окружается фагофорной мембраной через взаимодействие между Atg32 и Atg8, убиквитин-подобным белком, связанным с липидным фосфатидилэтаноламином и локализованном на автофагосоме, и образуется митофагосома, мембрана которой сливается с вакуолью-лизосомой, а содержимое постепенно гидролизуется. Некоторые исследователи наблюдали и микроавтофагоподобный процесс, который происходит без участия фагофора.

8.7. Роль митохондрий в апоптозе. Митоптоз

Митохондрии в клетках высших эукариот, помимо их известной роли в энергизации клетки и общем клеточном обмене, играют решающую роль в выборе клетки между жизнью и смертью, становиться на путь *апоптоза* или нет. Апоптоз — это генетически запрограммированный, четко отрегулированный, высоко координированный механизм гибели клеток, направленный на удаление невостребованных, поврежденных, инфицированных, ослабленных, закончивших свой жизненный цикл, потенциально опасных клеток.

До относительно недавнего времени полагали, что апоптоз свойственен лишь высшим многоклеточным, поскольку считалось, что одноклеточные организмы не имеют в своем геноме генов, аналогичных тем, которые кодируют апоптотические факторы многоклеточных. Однако сейчас описаны многочисленные случаи гибели клеток грибов по механизму апоптоза под действием различных неблагоприятных внешних факторов и внутриклеточных дефектов. Это и апоптоз клеток дрожжей *S. cerevisiae* в присутствии высоких концентраций феромона, и мицелиальные грибы, например, аскомицетный гриб *Podospora anserina*, для которого характерен синдром быстрого старения, приводящий к остановке роста и гибели клеток мицелия.

Особая роль митохондрий в системе выбора клетки между жизнью и смертью определяется тем, что они являются основными генераторами активных форм кислорода в клетке, а их межмембранное пространство служит депо проапоптотических факторов. При повреждении внешней мембраны проапоптотические факторы (цитохром *c*, эндонуклеаза G) выходят из митохондрий в цитоплазму, запускают и усиливают каскад реакций, приводящий в конечном итоге к гибели клетки. Ключевым событием апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий, что приводит к выходу цитохрома *c* и других проапоптотических факторов из межмембранного пространства в цитозоль и запуск реакций, приводящих к апоптозу. Регуляция апоптоза вовлекает dRP1 (динеин-подобный белок)-зависимую фрагментацию митохондрий у широкого круга организмов, включая дрожжи, червей, насекомых и позвоночных животных.

Помимо процесса фрагментации митохондрий и запуска реакций, приводящих к апоптозу, у ряда мицелиальных грибов (виды рода *Agaricus*) под действием стресса наблюдается *митоптоз* (программируемая смерть митохондрий), представляющий собой механизм самоликвидации опасных митохондрий, ставших таковыми в результате увеличения концентрации активных форм кислорода или неспособности эти радикалы устранять.. Митоптоз протекает в несколько стадий: характерным признаком начального этапа является появление вокруг фрагментированных митохондрий окружения из плотного слоя цитоплазматических рибосом (M_1), далее происходит повреждение наружной мембраны митохондрий и внедрение рибосом в межмембранное пространство, конденсация митохондриального

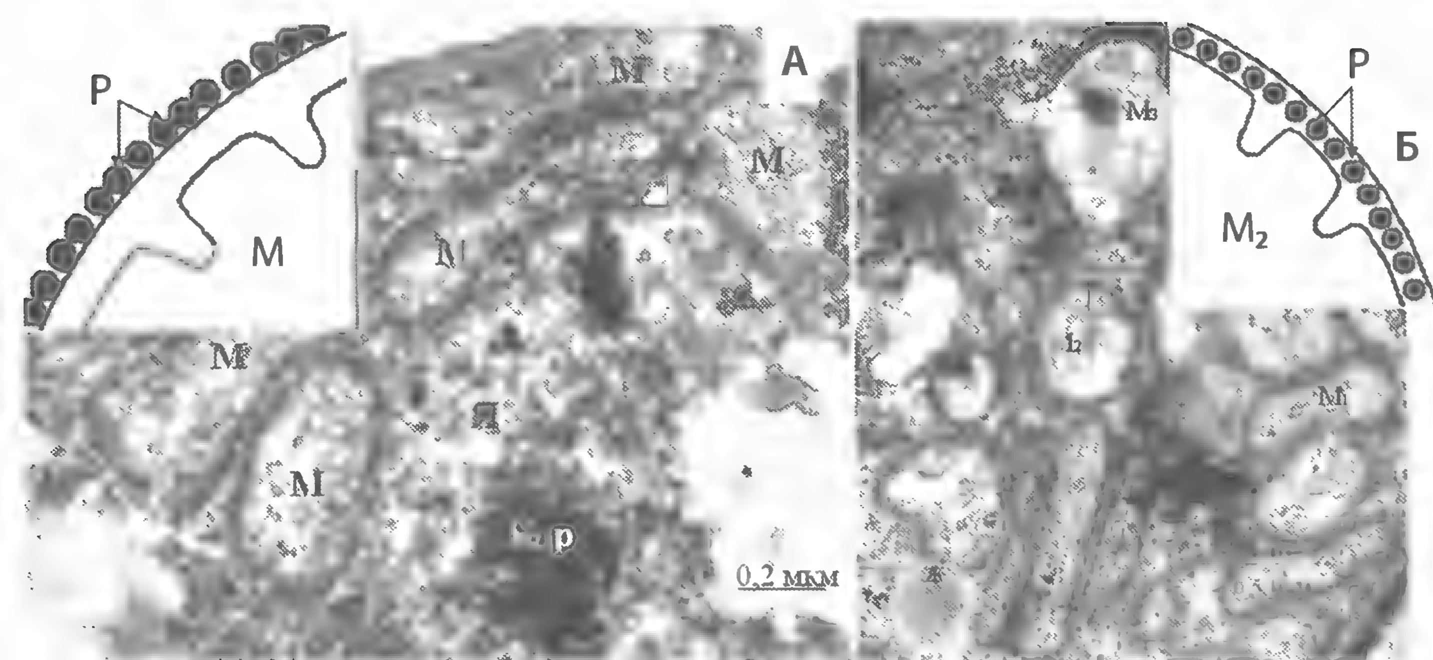


Рис. 88. Митоптоз у *Agaricus bisporus.* Скопление митохондрий в непосредственной близости от ядра в мицелии гомокариотического штамма *Agaricus bisporus* и схема фрагмента митохондрии (А). Фрагмент клетки глубинного мицелия *A. bisporus* и схема фрагмента митохондрии (Б). ТЭМ. Обозначения: М — митохондрия, Р — рибосомы, Ядр — ядрышко. Я — ядро. Подробности см. в тексте.

нуклеоида и деформация крист (M_2) вплоть до их полного исчезновения (M_3) (рис. 88А, Б). В клетках, находящихся на разных стадиях митоптоза, постепенно увеличивалась степень вакуолизации цитоплазмы и лизиса различных органелл клетки. Таким образом, гибель митохондрий, по-видимому, является частью программы гибели клетки.

8.8. Связь митохондрий с органеллами клетки

Проблема ядерно-митохондриальных взаимоотношений возникла с самого начала развития генетики митохондрий. Возможность передачи потомству мутаций дыхательной недостаточности у дрожжей как по менделевской схеме (ядерные мутации), так и через элементы цитоплазмы (цитоплазматические petite -мутации или ρ^-- мутации) сразу показала, что дыхательная функция клетки имеет ядерное и митохондриальное кодирование. Изучение мутаций дыхательной недостаточности возможно только в пределах ограниченного числа организмов, среди которых *S. cerevisiae* занимает лидирующее положение. Преимущества дрожжей связаны, прежде всего с тем, что они являются факультативными аэробами и их митохондрии могут быть генетически или физиологически инактивированы. Утрата активности митохондрий не влечет за собой гибели клеток (например, у ρ-мутантов). Мутанты дыхательной недостаточности делятся на две группы. Одни сохраняли ρ-фактор (ρ-фактор по современным представлениям эквивалентен мтДНК) в последующих скрещиваниях, но были неспособны к его экспрессии. Другие были лишены этого фактора.

То обстоятельство, что мтДНК может присутствовать, но не функционировать, и может полностью отсутствовать, демонстрировало не только контроль ядра над сборкой и функционированием митохондрий, но и контроль над способностью клетки поддерживать активно функционирующую мтДНК.

Так как митохондрии — полуавтономные органеллы, их нормальное функционирование зависит от других органоидов клетки. Уже было сказано, что некоторые полипептидные комплексы синтезируются в цитоплазме, т.е. кодируются ядром. Например, цитохром *с* оксидаза — центральный ферментный комплекс дыхательной системы, который представлен несколькими пептидными субъединицами. Было показано, что у *S. cerevisiae* этот комплекс состоит из 11 белков, три из них, являются продуктами митохондриальных рибосом, а восемь кодируются ядром и синтезируются на цитоплазматических рибосомах.

Была продемонстрирована тесная связь между митохондриями, пероксисомами и ядром у дрожжей. Эта связь заключается в регуляции работы органелл, так называемой ретроградной регуляции. Полагают, что такая регуляция играет важную роль в гомеостазе и биогенезе митохондрий.

Получено новое доказательство, что пероксисомы и митохондрии находятся в гораздо более тесных взаимоотношениях, чем полагали раньше. Пероксисомы и митохондрии — метаболически связанные органеллы. Они кооперируются в β-окислении жирных кислот и в метаболизме активных форм кислорода, а также используют один и тот же аппарат деления. Белки dnm1 и Fis1 у дрожжей, и dRP1, Fis1 и MFF у клеток животных участвуют в делении как митохондрий, так и пероксисом.

8.9. Гидрогеносомы

Гидрогеносомы были обнаружены примерно 35 лет назад. Эти органеллы присутствуют у разных неродственных анаэробных эукариот, у которых нет митохондрий (например, хитридиевые грибы, анаэробные флагелляты и цилиаты). Гидрогеносомы имеют сферическую или овальную форму, 1–2 мкм в диаметре, не содержат ДНК. Сходно с микротельцами белки гидрогеносом кодируются ядром, синтезируются в цитозоле и транспортируются в органеллы.

Полагают, что эти органеллы произошли от эндосимбиотических анаэробных бактерий или архей, хотя в случае трихомонад вопрос остаётся открытым. Предполагают также, что они могут быть сильно модифицированными митохондриями. Показано присутствие белков теплового шока (Hsp60 и Hsp70) в гидрогеносомах *Neocallimastix patriciarum*, которые участвуют в митохондриальном импорте и фолдинге (от англ. folding укладка) белков. Это может свидетельствовать о том, что гидрогеносомы имеют митохондриального предка или общего предка гидрогеносом и митохондрий.

Главная функция гидрогеносом — это окислительное декарбоксилирование пирувата, сопряженное с образованием АТФ, с электронным транспортом через ферредоксин, который заканчивается образованием молекулярного водорода.

Анаэробные хитридиевые (например, виды *Neocallimastix* и *Piromyces*) метаболизируют малат (образованный из глюкозы) с образованием АТФ и ацетата. Восстановленные

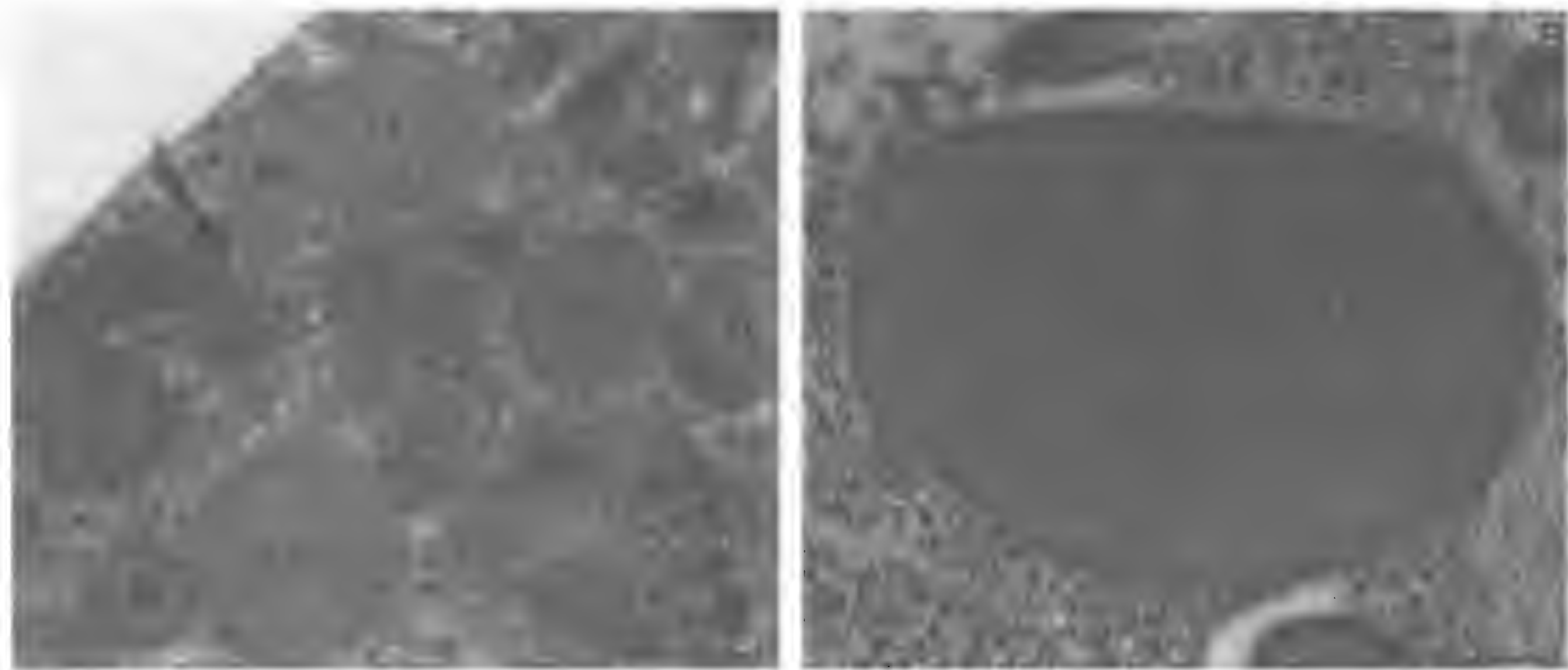


Рис. 89. Гидрогеносомы *Neocallimastix* sp. Частички золота выявляют присутствие [Fe]-гидрогеназы в матриксе гидрогеносомы (H) *Neocallimastix* sp. L2. R, рибосомы. Масштабный отрезок 0,5 мкм.
A. Кластер гидрогеносом. B. «Peas in a pod», или «горох в стручке» — стадия формирования мембранных включений в гидрогеносоме (Voncken et al., 2002).

эквиваленты в результате декарбоксилирования малата не переходят в митохондриальную электрон-транспортную цепь, но используются Fe-гидрогеназой для формирования молекулярного водорода.

Молекулярные механизмы биогенеза гидрогеносом еще во многом неизвестны. Гидрогеносомы делятся тремя способами, сходными с митохондриями: фрагментацией, делением пополам и в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Они могут делиться в любой фазе цикла клетки/организма и от нее не зависят. Они окружены двумя мембранами и имеют гранулярный матрикс. Гидрогеносомы анаэробного гриба *Neocallimastix* sp. имеют одну или множество периферических везикул, содержащих кальций (рис. 89). Периферические везикулы могут быть изолированы от матрикса гидрогеносом и представляют собой компартмент гидрогеносомы. Гидрогеносомы с нарушенными функциями удаляются автофагическим путем и подвергаются деградации в лизосомах.

Литература

Звягильская Р.А., Котельникова А.В. 1991. Структура и функциональная активность дрожжевых митохондрий // Итоги науки и техники. Серия Биологическая химия. М.: ВИНИТИ. Сер. Биол. Хим. Т.36. С.1–172.

Камзолкина О.В., Матросова Е.В. 2006. Митохондрии грибов (Обзор) // Ю.В. Сергеев (ред.). Успехи общей и прикладной микологии. М.: Национальная академия микологии. Т.1. С.47–66.

Матросова Е.В., Мажейка И.С., Кудрявцева О.А., Камзолкина О.В. 2009. Морфогенез и ультраструктура митохондрий базидиомицетов рода *Agaricus* и *Pleurotus* // Цитология. Т.51. No.6. С.490–499.

Физикова А.Ю. 2011. Наследование митохондрий у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Цитология. Т.53. No.5. С.383–391.

Albert B., Sellem C.H. 2002. Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging // Curr. Genet. Vol.40. P.365–373.

Altmann K., Frank M., Neumann D., Jakobs S., Westermann B. 2008. The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Cell Biol. Vol.181. No.1. P.119–130.

Ashrafi G., Schwarz T.L. 2013. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. Review // Cell Death and Differentiation. Vol.20. P.31–42.

Basse C.W. 2010. Mitochondrial inheritance in fungi // Current Opinion in Microbiology. Vol.13. P.712–719.

Berger K.H., Yaffe M. 2000. Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* // Trends Microb. No.8. P.508–513.

Boldogh I.R., Yang H.C., Nowakowski W.D., Karmon S.L., Hays L.G., Yates J.R., Pon L.A. 2001. Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.98. No.6. P.3162–3167.

Bullerwell C. E., Leigh J., Forget L., Lang B.F. 2003. A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes // Nucleic Acids Research. Vol.31. No.2. P.759–768.

Burgess S.M., Delannoy M., Jensen R.E. 1994. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria // J. Cell Biol. Vol.126. P.1375–1391.

Chelstowska A., Butow R.A. 1995. RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins // J. Biol. Chem. Vol.270. No.30. P.18141–18146.

Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A. 2000. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina* // Proc. Natl. Sci. USA. Vol.97. P.4138–4143.

Dürr M., Escobar-Henriques M., Merz S., Geimer S., Langer T., Westermann B. 2006. Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins Mfb1 and Mdm30 in maintenance of mitochondrial morphology in yeast // Mol. Biol. Cell. Vol.17. No.9. P.3745–3755.
Eisenberg T., Büttner S., Kroemer G., Madeo F. 2007. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis // Apoptosis. Vol.12. P.1011–1023.
Fagarasanu A., Mast F.D., Knoblach B., Rachubinski R.A. 2010. Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast // Molecular cell Biology. Nature Reviews. Vol.11. P.644–654.
Fannjiang Y., Cheng W.-C., Lee S.J., Qi B., Pevsner J., McCaffery J.M., Hill R.B., Basańez G., Hardwick J.M. 2004. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell in yeast // Genes and Development. Vol.18. P.2785–2797.
Frederick R.L., Okamoto K., Shaw J.M. 2008. Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast // Genetics. Vol.178. P.825–837.
Frederick R.L., Shaw J.M. 2007. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. Review // Traffic. Vol.8. P.1668–1675.
Fuchs F., Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // J. Cell Sci. Vol.115. No.10. P.1931–1937.
Gyawali R., Lin X. 2011. Mechanisms of uniparental mitochondrial DNA inheritance in *Cryptococcus neoformans* // Mycobiology. Vol.39. No.4. P.235–242.
Hausner G. 2003. Fungal mitochondrial genomes, plasmids and introns // Applied Mycology and Biotechnology. Vol.III: Fungal Genomics. P.101–131.
Hermann G.J., Shaw J.M. 1998. Mitochondrial dynamic in yeast // Cell Biol. No.14. P.265–303.
Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1504. P.179–195.
Kanki T., Klionsky D.J. 2010. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. MicroReview // Molecular Microbiology. Vol.75. No.4. P.795–800.
Kanki T., Klionsky D.J., Okamoto K. 2011. Mitochondria autophagy in yeast // Antioxidants & Redox Signaling. Vol.14. No.10. P.1989–2001.
Kiššová I., Salin B., Schaeffer J., Bhatia S., Manon S., Camougrand N. 2007. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast // Autophagy. No.3. P.329–336.
Knorre D.A., Popadin K.Y., Sokolov S.S., Severin F.F. 2013. Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells. Review Article // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol.2013. P.1–6.
Lackner L.L., Ping H., Graef M., Murley A., Nunnari J. 2013. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria–cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.110. No.6. E458–E467.
Lapuente-Brun E., Moreno-Loshuertos R., Acín-Pérez R., Latorre-Pellicer A., Colás C., Balsa E., Perales-Clemente E., Quirós P.M., Calvo E., Rodríguez-Hernández M.A., Navas P., Cruz R., Carracedo A., López-Otín C., Pérez-Martos A., Fernández-Silva P., Fernández-Vizarra E., Enríquez J.A. 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain // Science. Vol. 340. P.1567–1570.
Lee S.B., Taylor J.W. 1993. Uniparental inheritance and replacement of mitochondrial DNA in *Neurospora tetrasperma* // Genetics. Vol.134. P.1063–1075.
Madeo F., Herker E., Wissing S., Jungwirth H., Eisenberg T., Frühlich K-U. 2004. Apoptosis in yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.7. P.655–660.
Nowikovsky K., Reipert S., Devenish R.J., Schweyen R.J. 2007. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K+/H+ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy // Cell Death Differ. Vol.14. P.1647–1656.
Okamoto K., Kondo-Okamoto N., Ohsumi Y. 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy // Dev. Cell. Vol.17. P.87–97.

Osiewacz H.D. 2002. Aging in fungi: role of mitochodria in *Podospora anserina* // Mech. Ageing Dev. Vol.123. P.755–764.

Osiewacz H.D., Borghouts C. 2000. Mitochondrial oxidative stress and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina* // Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol.908. P.31–39.

Osteryoung W., Nunnati J. 2003. The division of endosymbiotic organelles //Science. Vol.302. P.1698–1704.

Pereira C., Silva R.D., Saraiva L., Johansson B., Sousa M.J., Côrte-Real M. 2008. Mitochondria-dependent apoptosis in yeast // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1783. P.1286–1302.

Rafelski S.M. 2013. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view // BMC Biology. Vol.11. No.71. P.1–9.

Schägger H., Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria // EMBO J. Vol.19. No.8. P.1777–1783.

Sellem C.H., Lemaire C., Lorin S., Dujardin G., Sainsard-Chanet A. 2005. Interaction between the *oxa1* and *rmp1* genes modulates respiratory complex assembly and life span in *Podospora anserina* // Genetics. Vol.169. P.1379–1389.

Shaw J.M., Nunnari J. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast // Trends Cell Biol. Vol.12. P.178–184.

Shepard K.A., Yaffe M.P. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance // J. Cell Biol. Vol.144. P.711–720.

Shlezinger N., Goldfinger N., Sharon A. 2012. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: The benefits in filamentous species. Review Article // Frontiers in Oncology. Molecular and Cellular Oncology. Vol.2. P.1–8.

Stevenson C.B., Fox A.N., Kennell J.C. 2000. Senescence assotiated with the over-replication of a mitochondrial retroplasmid in *Neurospora crassa* // Mol. Gen. Genet. Vol.263. P.433–444.

Strogolova V., Furness A., Robb-McGrath M., Garlich J., Stuart R.A. 2012. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex // Molecular and Cellular Biology. Vol.32. No.8. P.1363–1373.

Suelman R., Fischer R. 2000. Mitochondrial movement and morphology are depend on an actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans* // Cell Motil. Cytoskeleton. Vol.45. No.1. P.42–50.

Voncken F., Boxma B., Tjaden J., Akhmanova A., Huynen M., Verbeek F., Tielens A.G.M., Haferkamp I., Neuhaus H.E., Vogels G., Veenhuis M., Hackstein J.H.P. 2002. Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. // Molec. Microbiol. Vol.44. P.1441–1454.

Weber R., Wakley G., Pitt D. 1998. Histochemical and ultrastructural characterization of fungal mitochondria // Mycologist. Vol.12. Part 4. P.174–179.

Westermann B. 2008. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. Minireview // J. Biol. Chemistry. Vol.283. No.20. P.13501–13505.

Westermann B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death // Nature Reviews. Molecular cell Biology. Vol.11. P.872–884.

Westermann B., Prokisch H. 2002. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi // Fungal genetics and biology. Vol.36. P.91–97.

Wilson A.J., Xu J. 2012. Mitochondrial inheritance: diverse patterns and mechanisms with an emphasis on fungi // Mycology: An International Journal on Fungal Biology. Vol.3. No.2. P.158–166.

Wu M., Kalyanasundaram A., Zhu J. 2013. Structural and biomechanical basis of mitochondrial movement in eukaryotic cells. Review // International Journal of Nanomedicine. Vol.8. P.4033–4042.

Yang H-C, Palazzo A, Swayne T.C., Pon L.A. 1999. A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast // Current Biology. Vol.9. P.1111–1114.

Zick M., Rabl R., Reichert A.S. 2009. Review Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1793. P.5–19.

Глава 9.
Ядерный аппарат. Митоз. Мейоз[1]

9.1. Общие сведения

Ядро — основной структурный компонент эукариотической клетки. В связи с небольшим геномом у грибов ядра очень мелкие от 1 до 3 мкм, кроме того, большинство ядер грибов гаплоидны. Наиболее крупные ядра диплоидные, приуроченные к клеткам, связанным с половым процессом, например, в базидиях, сумках (диплоидное ядро в будущей сумке *Verpa bohemica* достигает 15 мкм), зигоспорах (ядро *Basidiobolus ranarum* достигает 30 мкм в диаметре).

У грибов встречаются одноядерные и многоядерные вегетативные клетки (табл. 4). Грибы, имеющие неклеточный мицелий (Zygomycota), содержат большое количество ядер (несколько десятков и даже сотен). Клетки хитридиевых грибов большей частью одноядерные. У сумчатых и базидиальных грибов число ядер в клетках варьирует от 1–2 до 100 и более в зависимости от систематического положения гриба, типа клеток (вегетативной или репродуктивной структуры), возраста. Так, например, у базидиомицета *Agaricus bisporus* клетки вегетативного мицелия содержат от 6 до 20 ядер, клетки субгимения плодового тела содержат 6 ядер, гимения по 2 ядра в клетке, а клетки ножки плодового тела — до 32 ядер на клетку. Для *Coprinopsis cinerea* с четко дикариотическими двуядерными клетками

---

[1] Сокращения

М — митоз
МТ — микротрубочки
Нп — нуклеопорины
НК — нуклеиновые кислоты
пг — пикограммы 1 пг = 10^{-9}мг = $0{,}6\times10^{12}$ дальтон = $0{,}9\times10^{9}$ п.н.
п.н. — пары нуклеотидов
ПТВ (англ. SPB, spindle pole body) — полярное тельце веретена
СК — синаптонемный комплекс
Яп — ядерная пора
ЯО — ядерная оболочка
checkpoints — контрольные точки
Da — дальтоны
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) — флуоресцентный краситель, который связывается с А-Т-богатыми регионами ДНК.
G_1, G_2 — стадии интерфазы клеточного цикла: G_1-фаза (от англ. *gap* — промежуток), или фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов: G_2-фаза, во время которой идет подготовка к митозу.
HMG-белки (от англ. high mobility gel proteins) — структурные и регуляторные белки с высокой подвижностью в геле
MEN — mitotic exit network — сеть белков, участвующих в выходе клетки почкующихся дрожжей из митоза и вхождении в стадию цитокинеза.
MPF от англ. mitosis promoting factor — фактор, способствующий наступлению митоза
NPC (англ. nuclear pore complex) — комплекс ядерной поры
S фаза клеточного цикла — стадия интерфазы клеточного цикла, во время которой происходит репликация ДНК
SEM (scanning electron microscopy) — сканирующая электронная микроскопия
feSEM (field emission scanning electron microscopy) — разновидность сканирующей электронной микроскопии

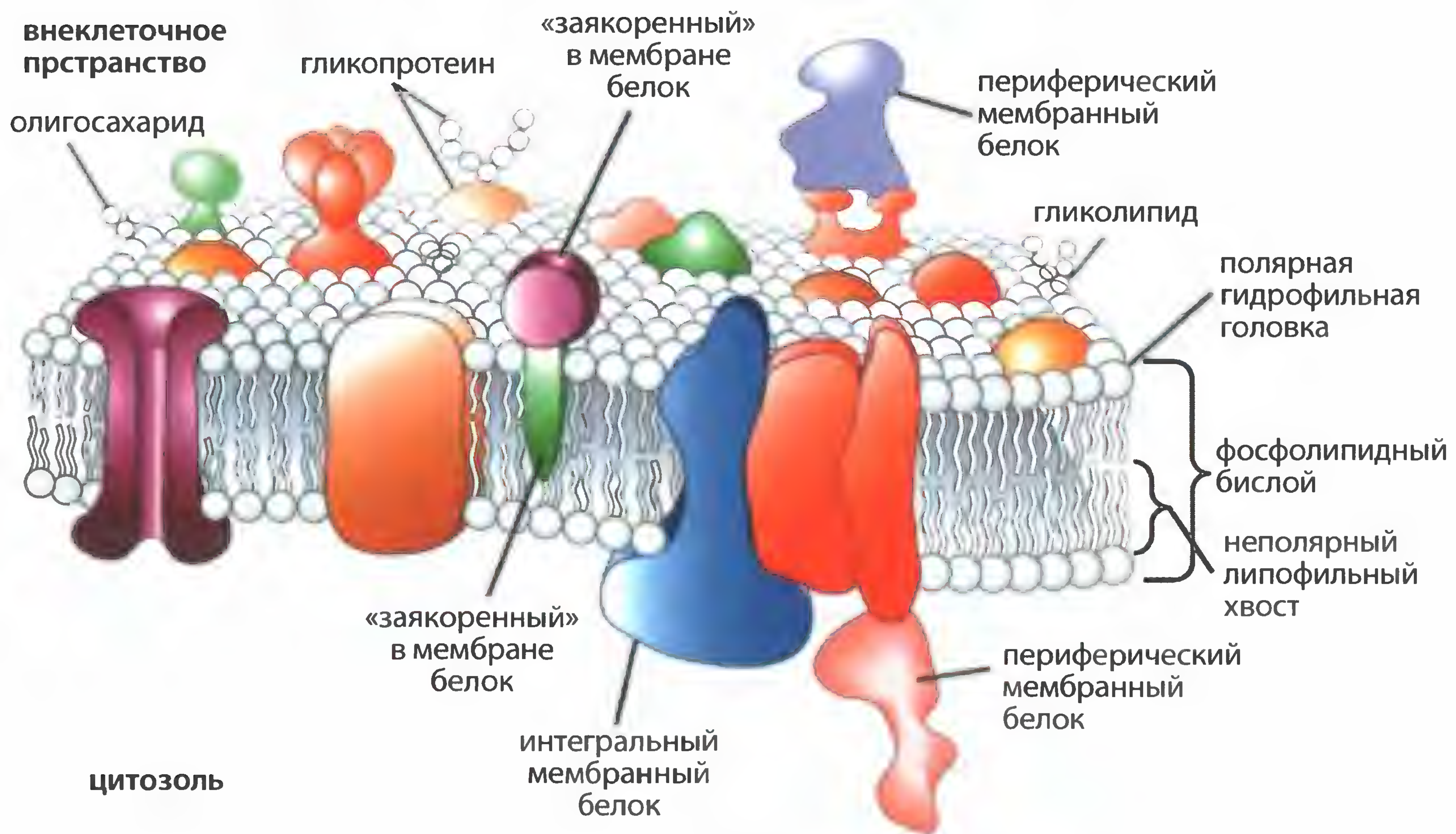


Рис. 1. Структура плазматической мембраны (мод. по Lodish et al., 2007).

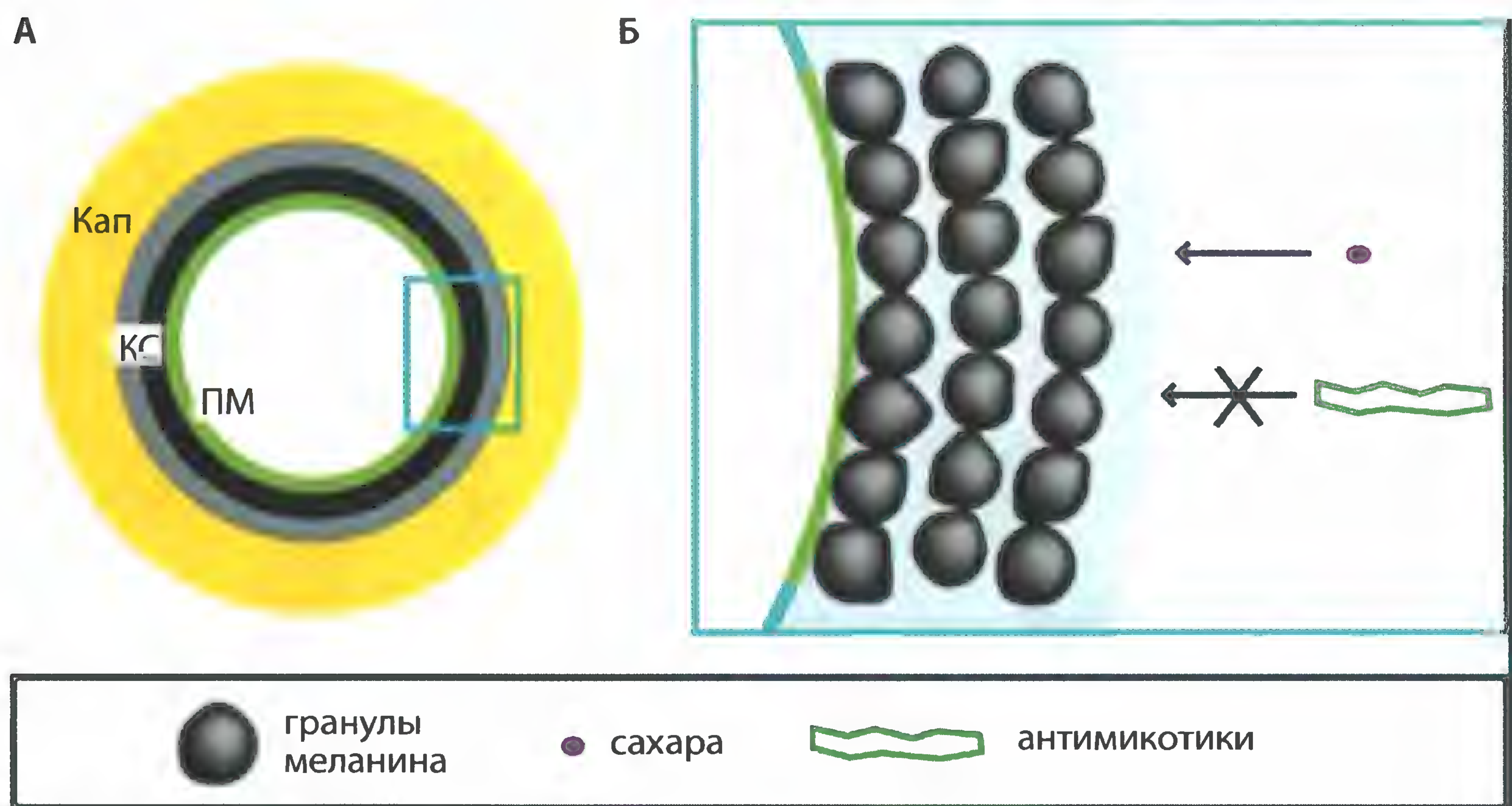


Рис. 7. Модель клеточных покровов и структуры меланина *Cryptococcus neoformans*.
(А) схема поперечного среза клетки *C. neoformans*. Кап — полисахаридная капсула. Меланин (черный) локализован в клеточной стенке (КС), следующим за плазматической мембраной (зеленая, ПМ). (Б) поперечное сечение меланин-содержащей клеточной стенки *C neoformans*. Меланин состоит из нескольких слоев гранулярных частиц. Согласно модели, сахара и аминокислоты могут проникать в клетку, проходя через пространство между частицами меланина. Крупные молекулы антимикотиков могут задерживаться слоем меланиновых гранул (Eisenman et al., 2005).

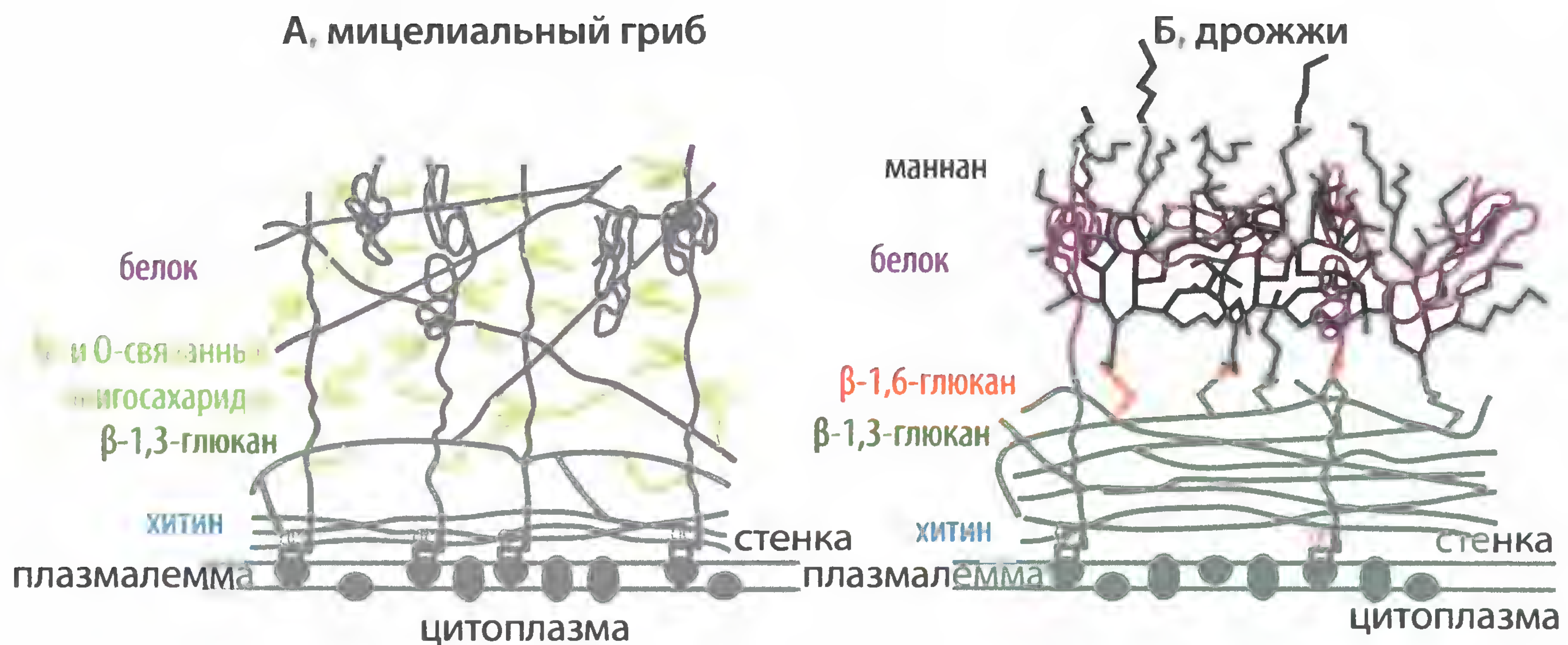


Рис. 8. Структуры грибной стенки.
А — структура мицелиальной грибной клеточной стенки. Большая часть хитина (голубой) расположена около плазматической мембраны, где он противостоит тургорному давлению протопласта, β-1,3-глюкан (зеленый) распространен по всей стенке. Белок (фиолетовый), глюкан и хитиновый компонент объединены в стенке поперечными связями с *N*- и *O*-связанными олигосахаридами (светло-зеленые). Некоторые гликопротеины имеют GPI якоря (красные), которые связывают их с плазматической мембраной, в то время как другие гликопротеины секретируются в матрикс стенки. Б — структура клеточной стенки дрожжей; маннаны (черные) доминируют в наружном слое клеточной стенки, β-1,6-глюкан (оранжевый) сшивает поперечно компоненты стенки (мод. по Bowman & Free, 2006).

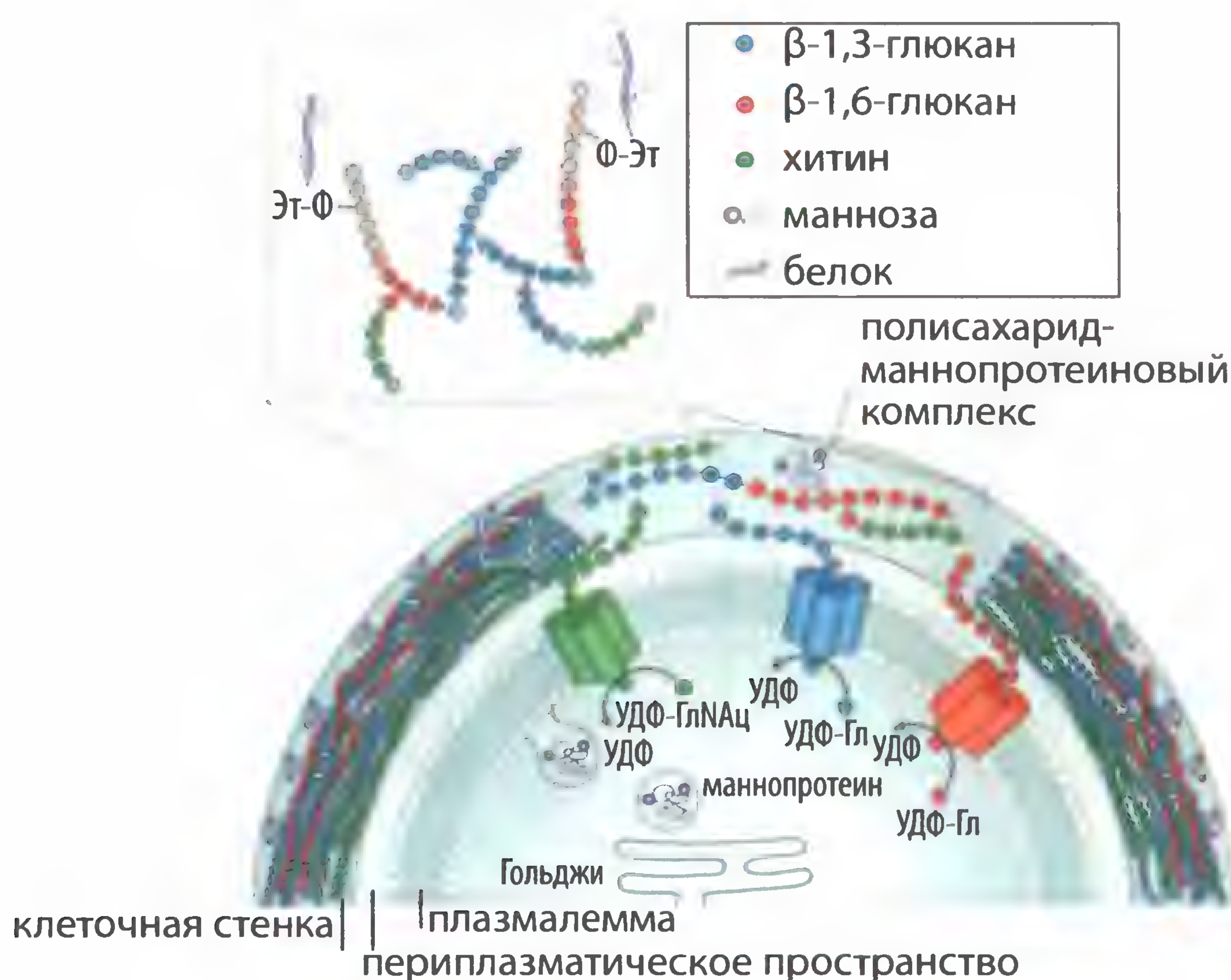


Рис. 14. Структура и синтез клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*. После завершения синтеза в ЭР и цистернах Гольджи маннопротеины упаковываются в везикулы и переносятся к плазмалемме, где происходит синтез таких полисахаридов как хитин, β-1,3-глюкан и β-1,6-глюкан, отделение от плазматической мембраны и попадание в периплазматическое пространство. Все эти компоненты связаны друг с другом в клеточной стенке в полисахарид-маннопротеиновый комплекс. Вставка показывает схематично этот комплекс. Соединение между маннопротеином и β-1,6-глюканом состоит из остатка гликозилфосфатидилинозитольный якоря. Обозначения: Эт — этаноламин; Гл — глюкоза; ГлNAц — *N*-ацетилглюкозамин; Ф — фосфат (Cabib, Arroyo, 2013).

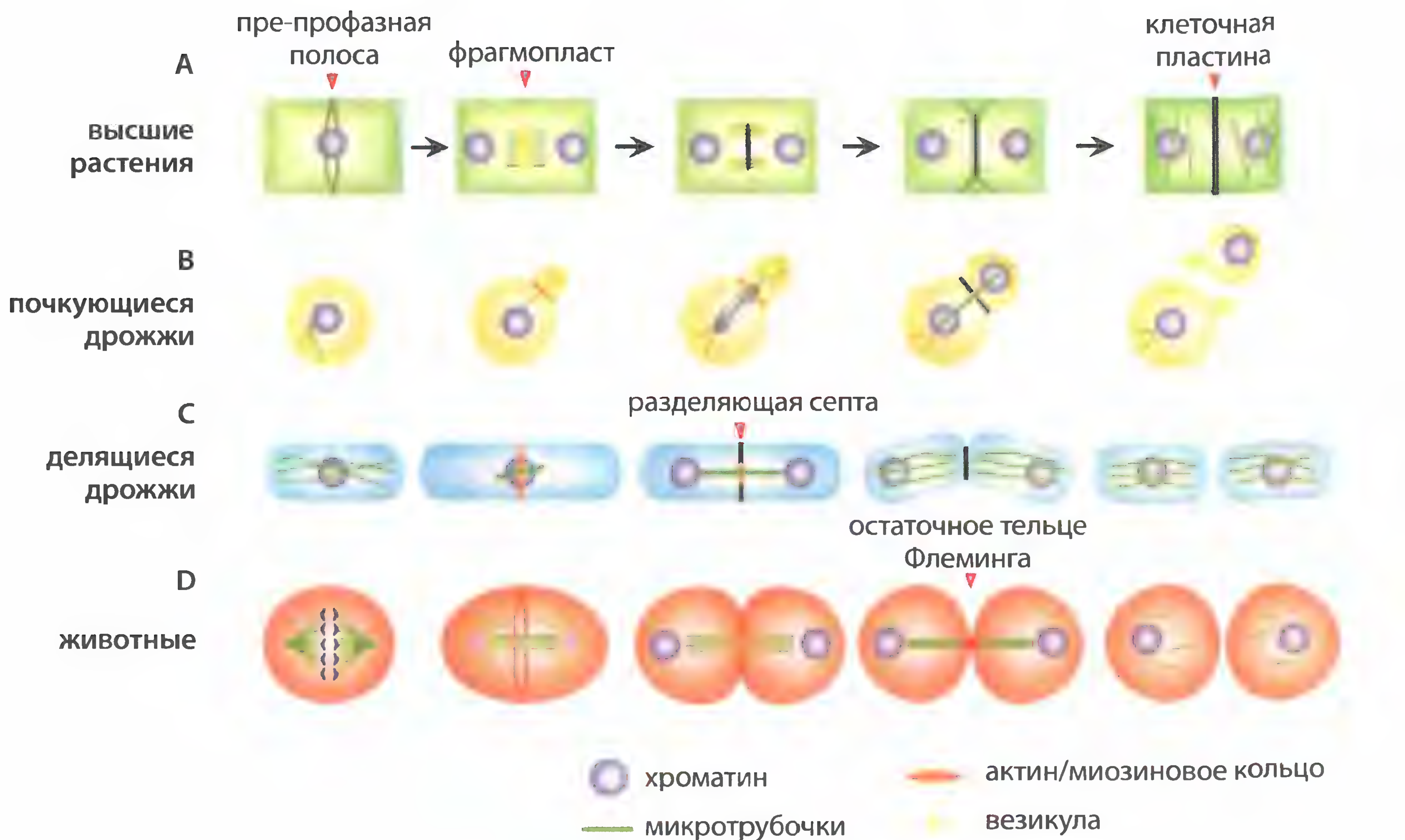


Рис. 21. Основные механизмы цитокинеза эукариот.
(A) Клетки высших растений: делятся с формированием клеточной пластинки. Этому предшествует образование фрагмопласта, состоящего из микротрубочек, ориентированных перпендикулярно продольной оси деления клетки. К фрагмопласту в медианной области доставляются везикулы, несущие материал клеточной стенки. Везикулы сливаются, образуя клеточную пластинку, которая растет от центра к кортексу клетки, вытесняя фрагмопласт.
(B и C). Дрожжи и клетки животных, в отличие от клеток растений, делятся с использованием актомиозинового сократительного кольца (B). У почкующихся дрожжей кольцо располагается в пространстве между материнской и дочерней клетками в перешейке. (C). У делящихся дрожжей и клеток животных сократительное кольцо располагается центрально, так как оба типа клеток делятся медиальной бороздой. Делящиеся и почкующиеся дрожжи синтезируют септу за сократительным кольцом, которое постепенно деградирует, что приводит к физическому разделению клеток.
(D). У животных сжимающаяся борозда сужает срединное веретено деления в плотную структуру, называемую «тельце Флеминга» (или midbody) (Guertin, Trautmann, McCollum, 2002).

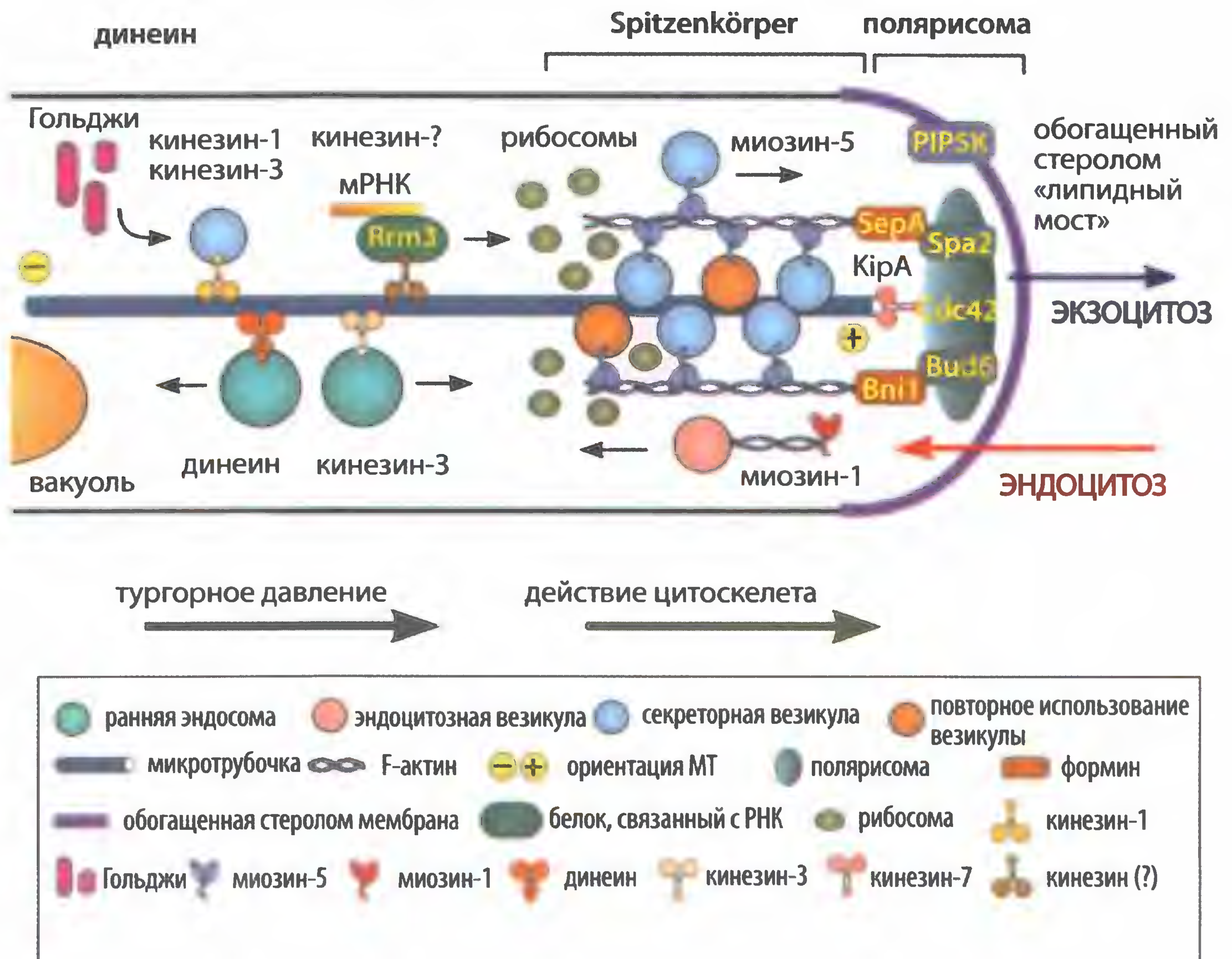


Рис. 39. Модель роста гифы. Обогащенный стеролом мембранный домен сконцентрирован на верхушке гифы, что облегчает эндоцитоз. Миозин-1 принимает участие на начальных этапах эндоцитоза, полимеризованный актин удаляет везикулы от мембраны. Липидный мост может служить опорой для апикальных белков, таких как фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназы (PIP5K), что генерирует функциональный микродомен, пополняющий компоненты полярисомы (Bud6 and Spa2) и Cdc42. Spa2 и Bud6 связывают формин, который непосредственно участвует в зарождении и полимеризации F-актина цитоскелета. Следовательно, становится возможным удаление экзоцитозных везикул на кончике. МТ заякорены на кончике гифы через кинезиновые моторы, которые поддерживают транспорт на длинных дистанциях с участием кинезина-1- и кинезина-3, чтобы удалить везикулы, но также должны доставлять мРНК к кончику, где происходит грансляция на апикальных рибосомах и дальнейшая модификация в эндоплазматическом ретикулуме и апикальном аппарате Гольджи. Известно, что эндоплазматический ретикулум также концентрируется на кончике гифы, но он не показан для простоты. Транспорт на короткие дистанции осуществляется при участии моторов миозина-5. Везикулы запасаются в Spitzenkőrper, который определяет рост гифы путем контролируемого экзоцитоза. Под действием тургорного давления и деятельности цитоскелета кончик гифы перемещается вперед. Данные получены на нескольких модельных грибах: *Fusarium acuminatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* и *Ustilago maydis* (Steinberg, 2007).



Рис. 40. Сборка микротрубочек.
а. Гетеродимер α-тубулин-β-тубулин (αβ-тубулин) является основной повторяющейся субъединицей микротрубочек. Связываясь с ГТФ (показано оранжевым цветом на левом рисунке), гетеродимеры проходят вместе через два типа контактов (показано двухсторонними стрелками): ГТФ-опосредованные продольные контакты образуются между α-тубулином и β-тубулином, они формируют протофиламенты; боковые α-тубулин-α-тубулин и β-тубулин-β-тубулин контакты образуются между протофиламентами. В микротрубочках, состоящих из 13 протофиламентов, образуется «борозда»='seam' как результат боковых взаимодействий α-тубулина-β-тубулина.
б. Спонтанный рост микротрубочки *in vitro* происходит в две стадии: относительно медленная фаза при сборке нестабильных интермедиатов на ранней стадии, и быстрая стадия удлинения. На ранних стадиях сборки энергетически предпочтительнее разборка по сравнению со сборкой, но после формирования крупного олигомера (через N шагов) энергетически более выгодно удлинение. Энергетически выгодные процессы показаны жирной стрелкой. Наличие затравки вызывает быструю полимеризацию микротрубочек, пропуская лаг-фазу, наблюдаемую при спонтанном росте (Kollman et al., 2011).

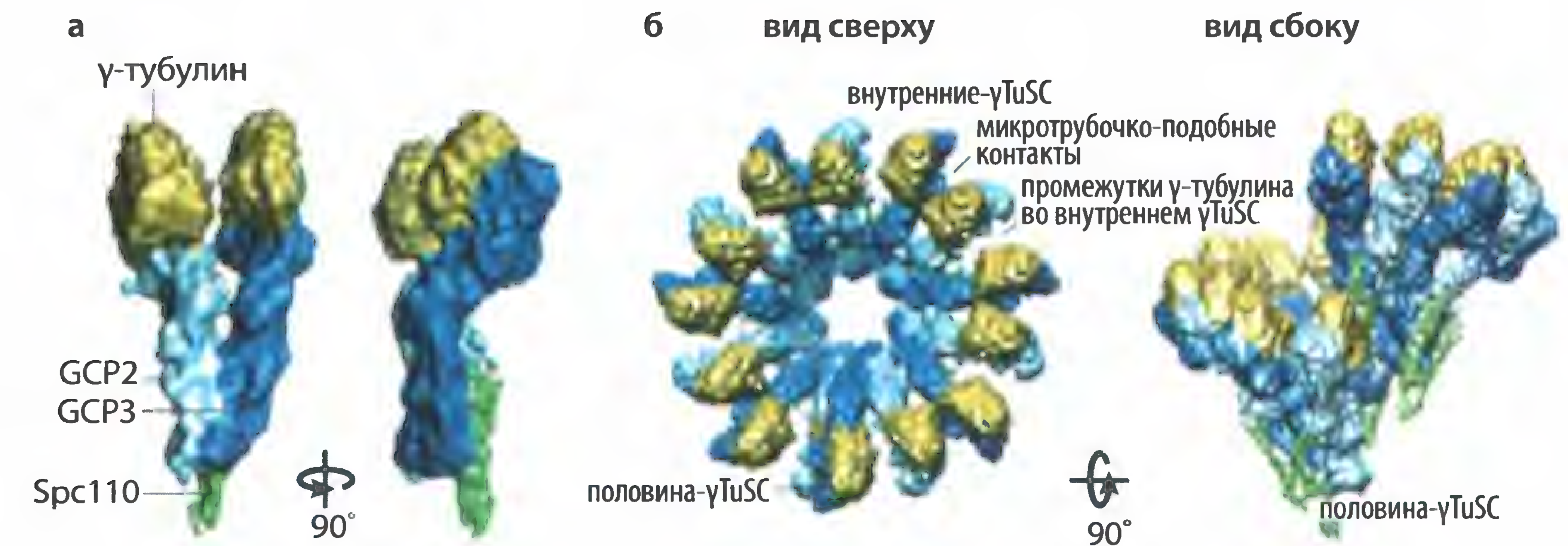


Рис. 41. Структура γTuSC и γTuRC. а. Крио-электронная микроскопия 8 Å структуры γ-тубулинового малого комплекса (γTuSC) у *Saccharomyces cerevisiae*, связанного с компонентом полярного тела веретена 110 (Spc110). γTuSC представляет собой одну субъединицу крупного γ-тубулинового олигомера γTuRC Амино-концы белков GCP2 и GCP3 γ-тубулинового комплекса находятся внизу, карбокси-концы взаимодействуют с γ-тубулином и находятся наверху рис. 41а. б. Вид сверху и сбоку кольца γTuRC. Кольцо имеет шесть с половиной γTuSC на оборот (половина между первой и седьмой субъединицей γTuSC в кольце) (Kollman et al., 2011).

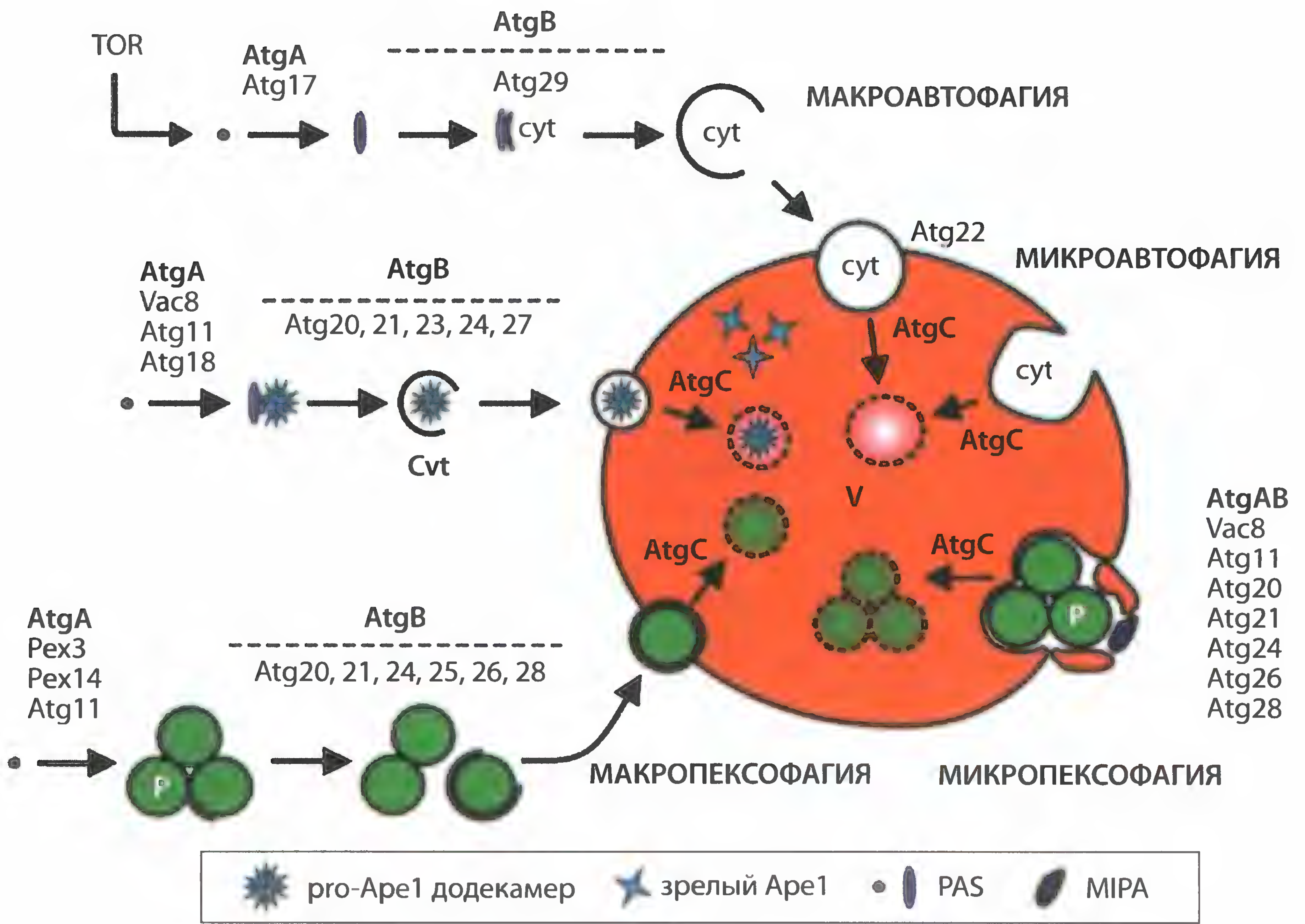


Рис. 68. Схема макроавтофагии и других родственных автофагии процессов. Макроавтофагия, Cvt путь и макропексофагия включают фомирование двухслойной (или многослойной) мембраны, которая окружает груз. Это может быть порция цитоплазмы (cyt) в процессе макроавтофагии, формирующиеся додекамеры proApe1 в пути Cvt или пероксисома (P) при макропексофагии. После завершения изоляции наружная мембрана образовавшейся везикулы сливается с мембраной вакуоли, что приводит к включению окруженного мембраной груза в просвет вакуоли (V). Постепенно вакуолярные липазы лизируют мембрану везикулы. Вакуолярные протеазы либо деградируют содержимое везикулы (макроавтофагия и макропексофагия), или обеспечивают созревание proApe1 додекамеров (Cvt путь). На схеме также показаны процессы микроавтофагии и микропексофагии, в процессе которых вакуолярная мембрана выщепляет порции цитозоля (микроавтофагия) или полностью окружает кластер пероксисом (микропексофагия). Белки Atg, которые участвуют в каждом пути, перечислены в соответствующих сайтах действия. Для упрощения белки, которые участвуют во всех связанных с автофагией путях сгруппированы вместе. AtgA представляет белки, которые участвуют в инициации процессов, родственных автофагии, и включают Atg1, 6, 13 и 14, а также Vps15 и 34. AtgB представляет белки, участвующие в формировании изолирующей мембраны (Atg2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 16 и 18), в то время как AtgC представляет Atg15 и другие гидролитические ферменты, присутствующие в вакуолярном люмене, а также транспортные белки вакуолярной мембраны (Meijer et al., 2007).

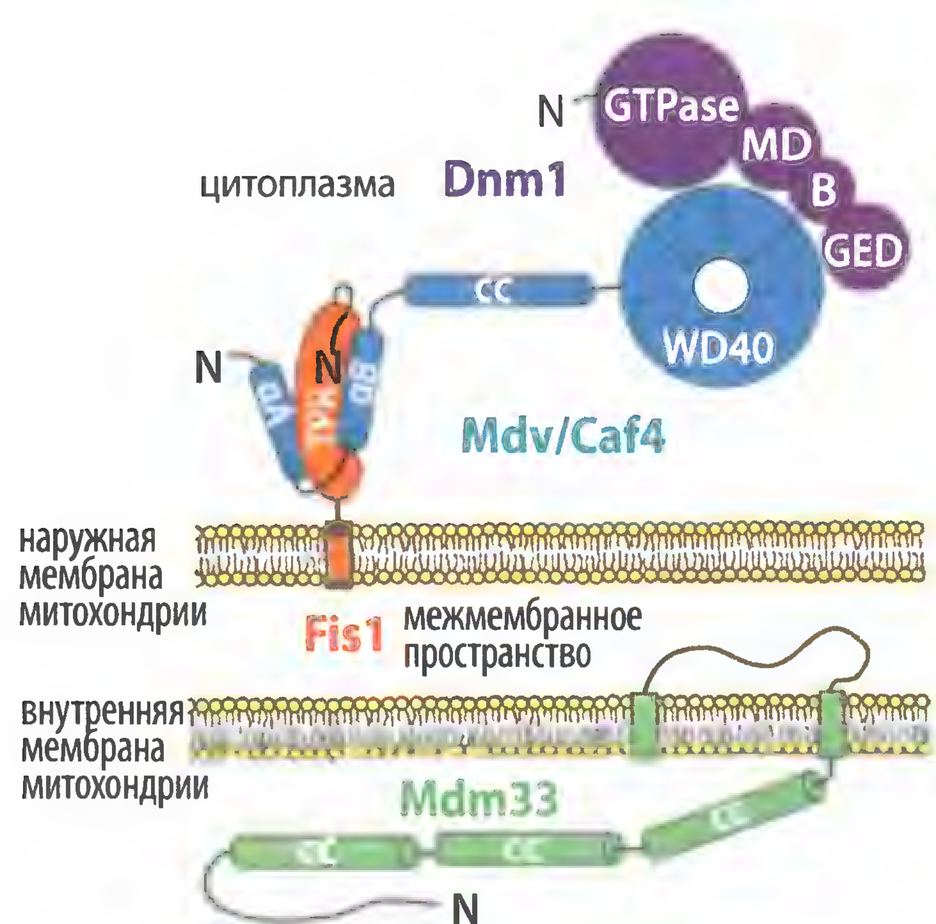


Рис. 82. Модель молекулярной машины деления митохондрий у дрожжей.
На начальной стадии деления белок Fis1p является мишенью для привлечения Dnm1p к мембране митохондрий и регулирует его сборку. Позднее Fis1p ограничивает скорость деления митохондрий. Белки Mdv1 и Caf4 имеют доменную организацию и выполняют функцию адапторов, связывающих Dnm1 с Fis1. Домен Mdv1p WD облегчает взаимодействие с собранным Dnm1p. Белок Dnm1p обеспечивает образование перетяжки и физическое разделение мембран митохондрий при делении. Mdm33 содержит несколько прогнозируемых спирально закрученных районов в матриксе митохондрий и контролирует морфологию митохондрий у дрожжей.
Обозначены N-концы каждого полипептида; αA и αB, α спирали на N-концевых участках Mdv1 и Caf4 соответственно; B — вставочный домен B; cc — спирально закрученный домен; GED — GTPаза-эффекторный домен; MD — средний домен; TPR — четырехпептидные повторы (Westermann, 2008).

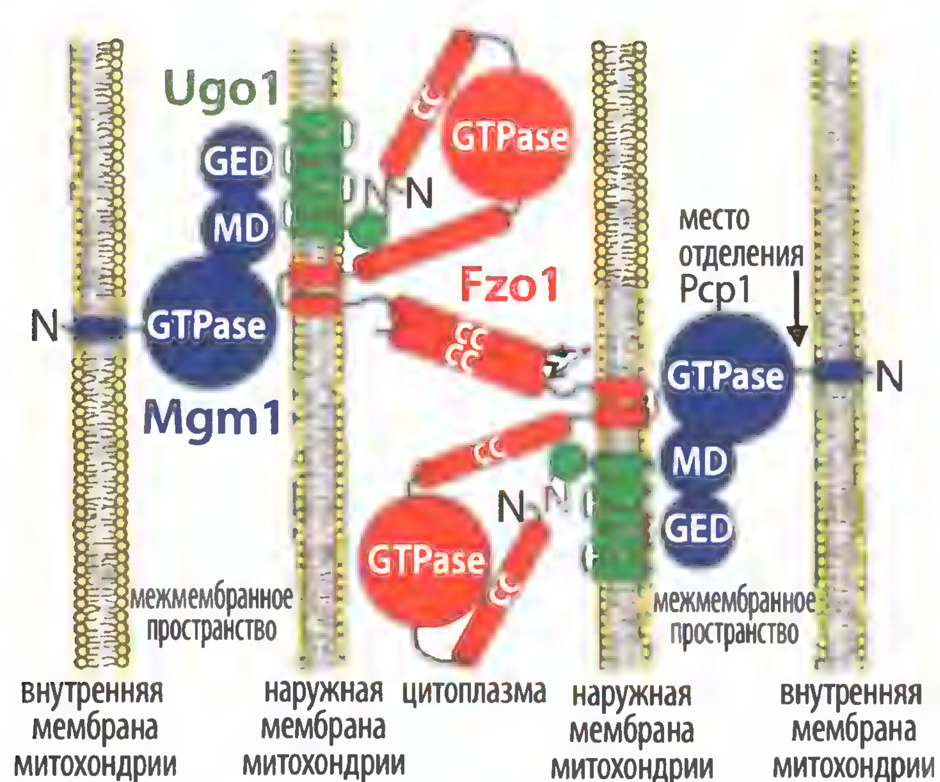


Рис. 83. Модель молекулярной машины слияния митохондрий у дрожжей. Процесс слияния митохондрий можно разделить на три этапа — фиксация органелл, слияние наружных и слияние внутренних мембран органелл. За осуществление первого этапа отвечает белок Fzo1, который фиксирует две митохондрии друг относительно друга с помощью спирально закрученных (coiled-coil) доменов. В месте контакта происходит соприкосновение наружной и внутренней мембран митохондрий в результате связывания белков Fzo1 и Mgm1 белком Ugo1. Слияние мембран зависит от присутствия ГТФ. Белок Mdm30p контролирует содержание Fzo1p в наружной мембране. Комплексы инактивированных белков Fzo1 отправляются на убиквитин-зависимую протеолитическую деградацию. Две молекулы Fzo1, являющихся в митохондриях частью крупного 800 kDa комплекса неизвестного состава, связывают две смежные митохондрии путем димеризации антипараллельных спирально закрученных C-концевых регионов (стрелки). Ugo1 содержит до пяти пересекающих мембрану участков. Неизвестно, какая из частей Ugo1 взаимодействует с Fzo1 и Mgm1. Mgm1 существует в митохондрии в двух формах, длинная форма, имеющая трансмембранный участок на внутренней мембране, и короткая форма без этого участка в результате отщепления Pcp1. Неизвестно, какой домен Mgm1 взаимодействует с компонентами наружной мембраны. Обозначены N-концы каждого полипептида; cc — спирально закрученный домен; GED — GTPаза-эффекторный домен; MD — средний домен (Westermann, 2008).

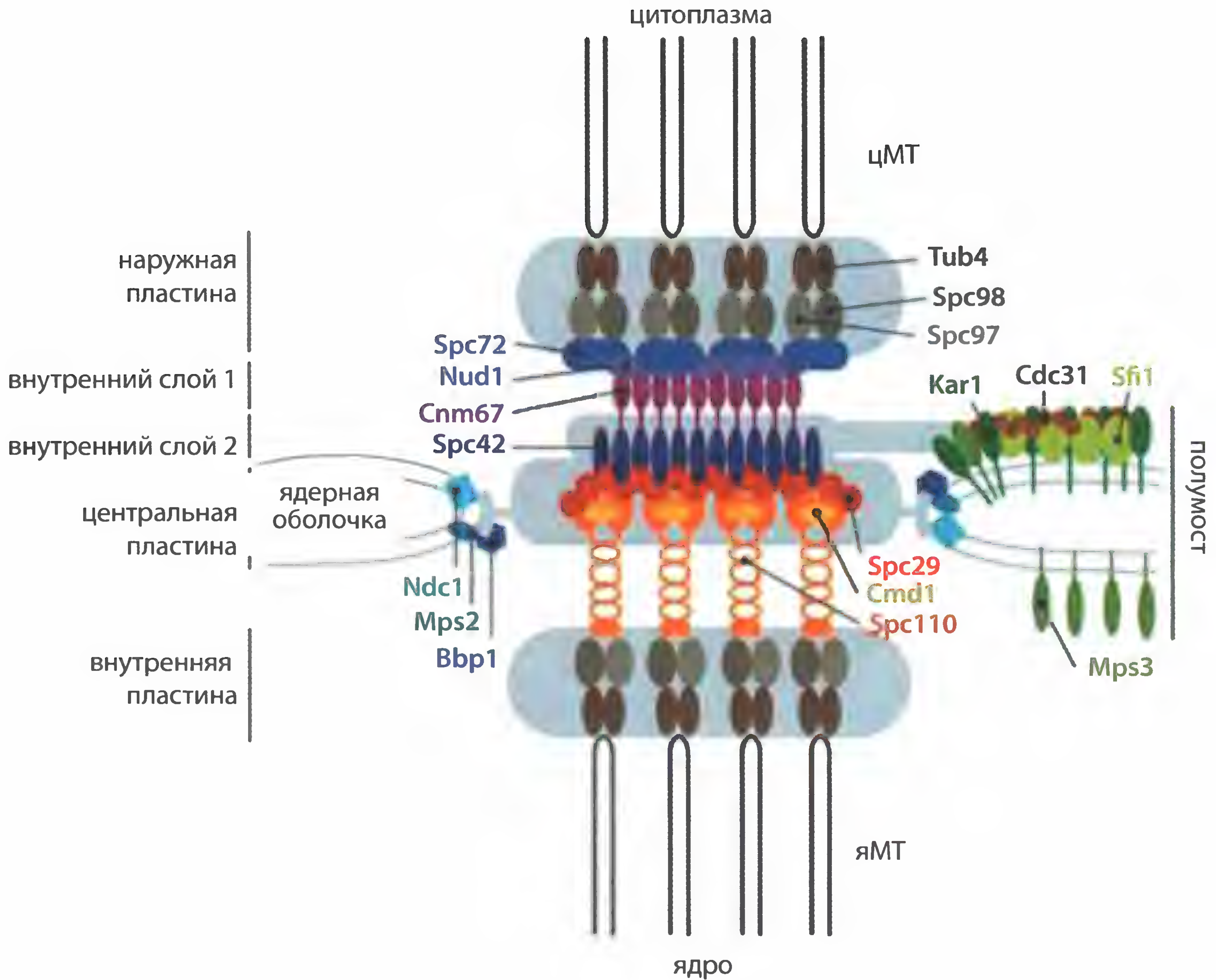


Рис. 97. Состав белков ПТВ.
Положение компонентов ПТВ показано вместе с ядерными, цитоплазматическими микротрубочками (яМТ и цМТ) и ядерной оболочкой. Детальное описание компонентов в тексте (Jaspersen, Winey, 2004).

вегетативного мицелия, клетки ножки зрелого плодового тела становятся многоядерными и могут иметь до 156 ядер, благодаря серии митотических делений (табл. 4).

Таблица 4

Количество ядер в клетках ножки плодового тела у некоторых базидиальных грибов

Таксон	Число ядер
Agaricus bisporus	4–32
Armillaria mellea	1
Ashbya gossypii	1–10
Aspergillus nidulans	10–60
Coprinopsis cinerea	2–156
Flammulina velutipes	2–32
Lentinula edodes	2–8
Neurospora crassa	1–100
Pholiota nameko	2–4
Schizophyllum commune	1–2
Ustilago maydis	1–2
Volvariella bombycina	5–30

Споры также могут быть одно-, двух-, четырехядерные и более в зависимости от систематической принадлежности гриба (*Mucor mucedo* — 15–20 ядер на спорангиоспору, *Neurospora crassa* — 2 ядра на аскоспору, *A. bisporus* до 8 ядер на базидиоспору).

Ядро грибов чаще всего расположено в центре гифы, но у стареющих клеток прижато к стенке клетки. В процессе роста мицелия положение ядра может меняться при участии микротрубочкового цитоскелета. Ядра свободно перемещаются в цитоплазме через перфорированные септы за исключением септ базидиомицетов. Однако даже у них возможна миграция ядер по мицелию на определенных стадиях развития (в процессе *дикариотизации* мицелия), благодаря ферментативному растворению септ.

По форме ядра чаще округлые, а в верхушечных клетках вытянутые. Подробное изучение ядерного аппарата проводили у представителей класса Ascomycetes. Для каждого типа клеток у одного и того же аскомицета характерны свои размеры и форма ядер. Например, форма и размеры ядер (мкм) у разных типов клеток *Pustularia cupularis* (Ascomycota) следующие:

Типы клеток	Форма	Размер, мкм
Парафизы	эллипсоидальная	длина до 4,5, ширина до 1,5
Сумки	сферическая	до 6
Мицелий	сферическая	1

В развивающихся спорах ядра могут быть эллипсоидальными, сферическими или лопастными. Причем форма ядра часто коррелирует с формой споры.

Основные функции ядра – хранение и репликация ДНК. В ядре осуществляется контроль синтеза нуклеиновых кислот (транскрипция) и созревания РНК.

9.2. Структура ядра

9.2.1. Ядерная оболочка и поры

Ядро окружено двойной мембраной, называемой нуклеолеммой или *ядерной оболочкой* (ЯО) (рис. 90), которая с цитоплазматической стороны соединена с эндоплазматическим ретикулумом. Ядерная оболочка отделяет хроматин и белки ядерного матрикса от цитоплазмы и является опорой для разных ядерных и хромосомных структур, включающих полярное тело веретена (ПТВ, spindle pole body).

Транспорт между нуклеоплазмой и цитоплазмой осуществляется через множество комплексов *ядерных пор* (Яп, у *Saccharomyces cerevisiae* 200 пор/ядро), которые обеспечивают свободную диффузию маленьких молекул и регулируемый транспорт макромолекул (рис. 91). Ядерная пора представляет собой сложно устроенный белковый комплекс весом примерно 50 МДа и содержит у *S. cerevisiae* порядка 456 полипептидов-нуклеопоринов (Нп) 30 разных типов (рис. 92). Некоторые нуклеопорины имеют трансмембранные домены, которые закрепляют комплекс поры в ядерной мембране. Часть из них составляют основу кольцевой структуры, которая пересекает ядерную оболочку. Центр этой кольцевой структуры называется центральный канал, который работает как шлюз между ядром и цитоплазмой. Центральный канал комплекса ядерной поры занимают Нп с фенилаланил-глициновыми повторами. Другие белки формируют цитоплазматические фибриллы и ядерную корзину. Нп с фенилаланил-глициновыми повторами ограничивают диффузию макромолекул через центральный канал Яп. Через середину порового канала проходят гибкие белковые филаменты в цитоплазму и нуклеоплазму, обеспечивая места связи как для белков, так и для хроматина. Поры способны контролировать обмен веществ между нуклео- и цитоплазмой. Перед митотическим делением ядерные поры у *A. nidulans* претерпевают частичную разборку (рис. 93), что облегчает диффузию макромолекул, участвующих в митозе (подробнее см. в разделе Митоз).

К основным функциям ядерных пор относят транспорт готовых рибосомных субъединиц в цитоплазму и транспорт макро- и микромолекул между ядром и цитоплаз-

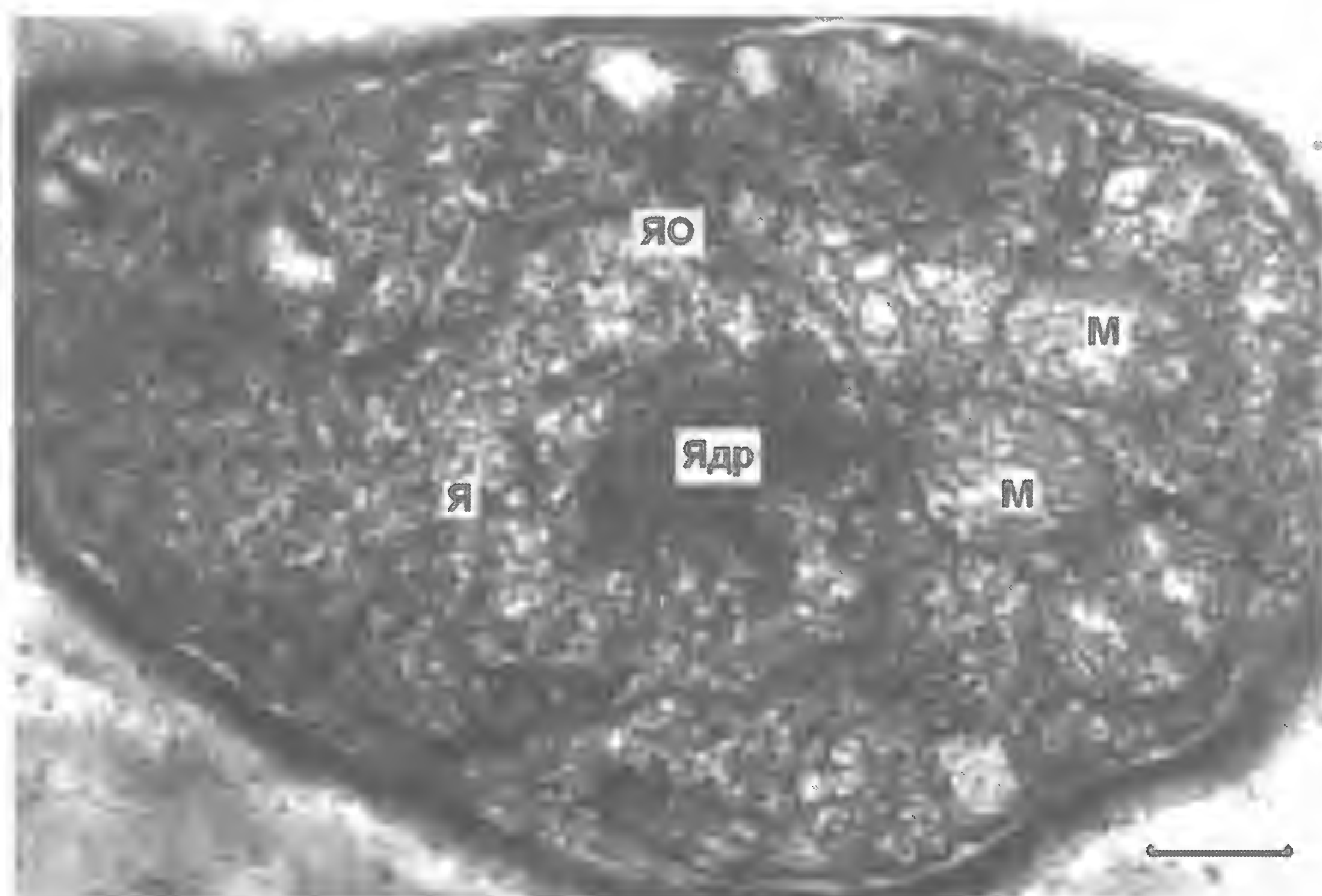


Рис. 90. Интерфазное ядро *Agaricus bisporus*. Обозначения: М — митохондрия, Ядр — ядрышко, Я — ядро, ЯО — ядерная оболочка. Масштабный отрезок 300 нм

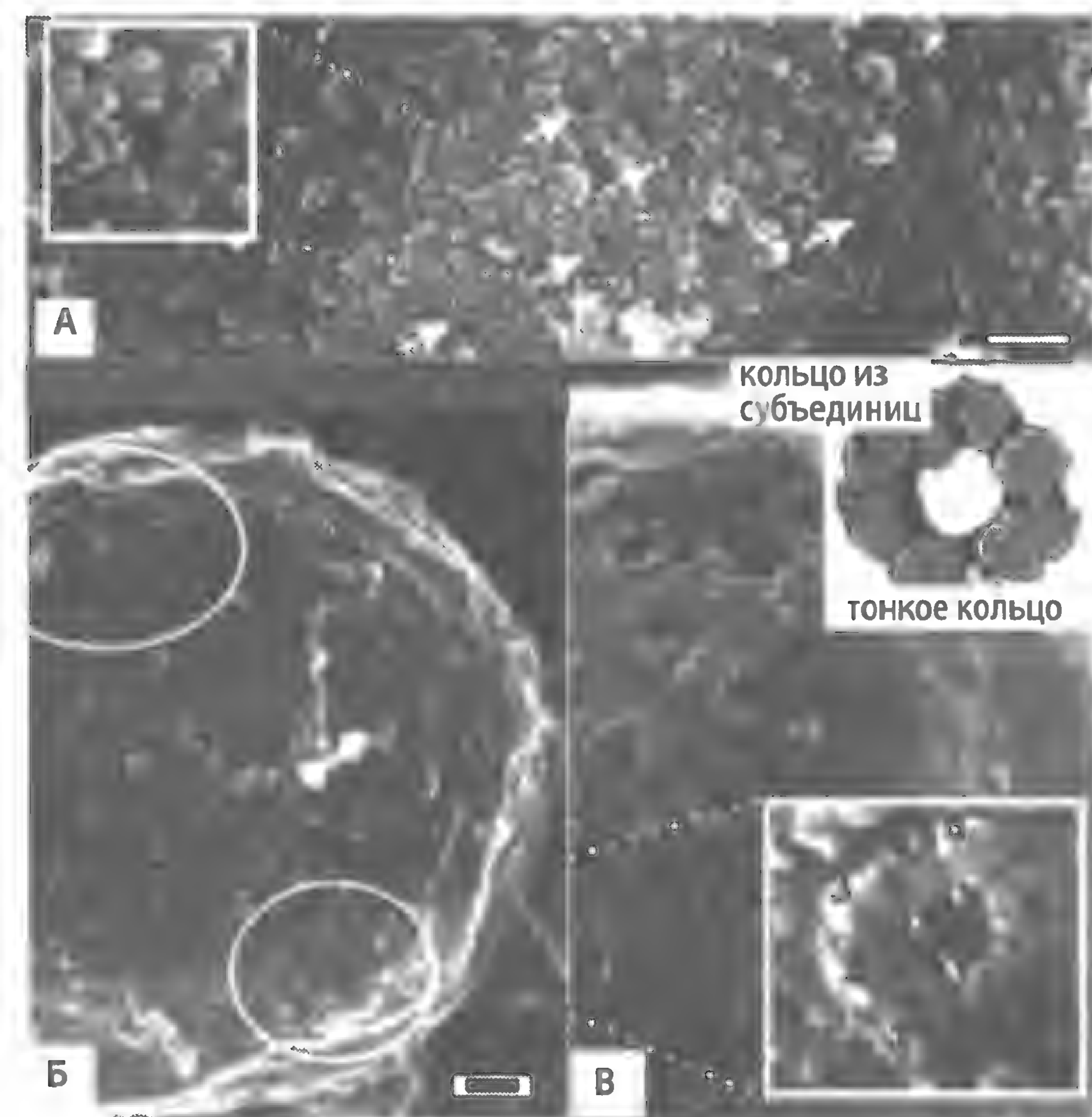


Рис. 91. Комплексы ядерной поры у дрожжей.
Изолированное ядро *Saccharomyces cerevisiae* с рибосомами (А), где комплексы ядерной поры (NPCs) (стрелки и вставка) трудно вычленить, и после удаления рибосом с помощью раствора 0,3 М NaCl (Б, В). Ядра изолировали или из сферопластов (А, Б) или путем вычленения при замораживании (В). NPCs иногда кластеризовались (Б — кольца). Заметны периферические компоненты NPC (В), которые включают восемь субъединиц кольца, локализованных со стороны цитоплазмы (они пронумерованы в нижней вставке и серого цвета в верхней вставке); тонкое кольцо (обозначено белыми стрелками на нижней вставке и черного цвета на верхней). Масштабный отрезок 100 нм (Kiseleva et al., 2004).

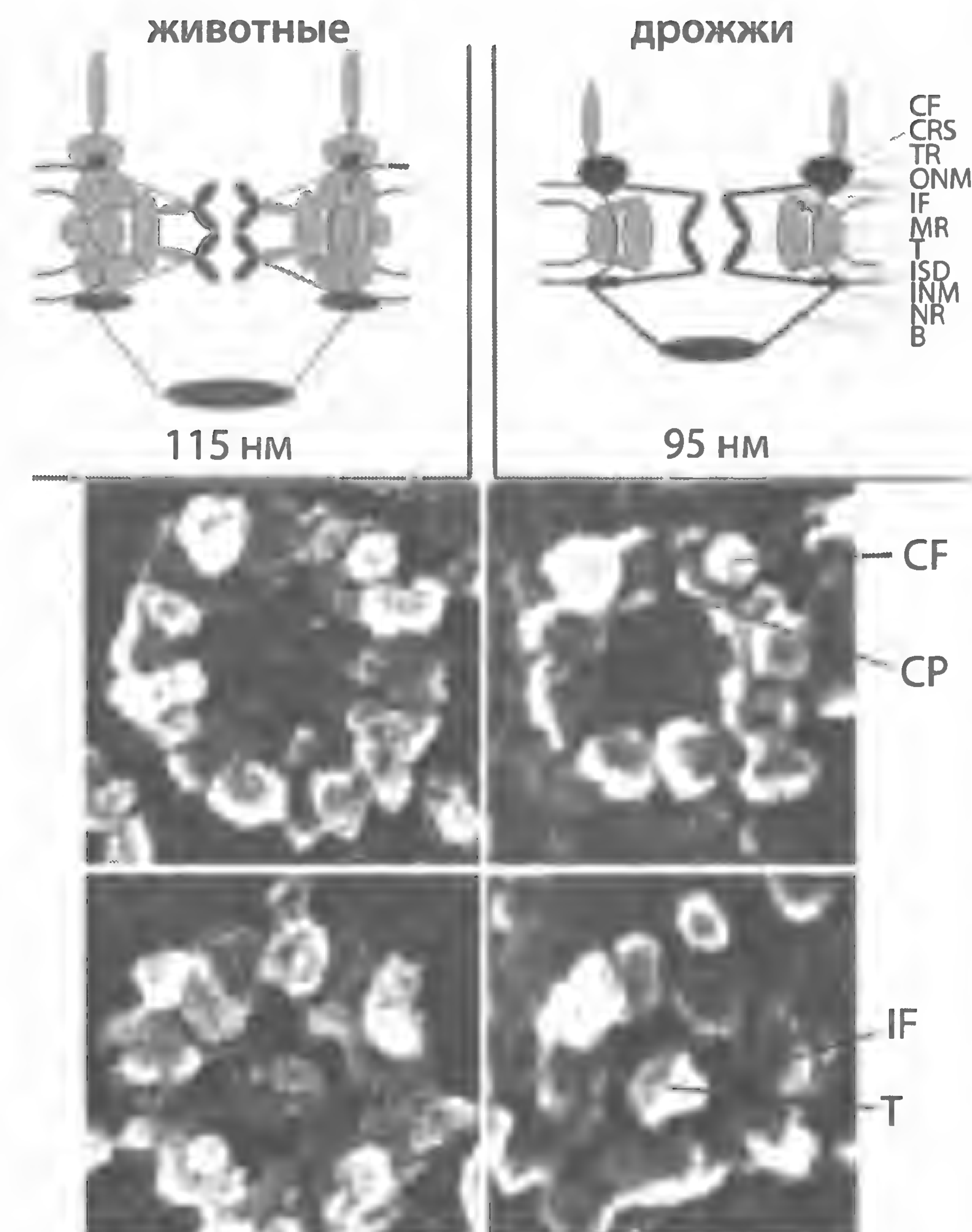


Рис. 92. Модель и фотографии цитоплазматической стороны ядерной поры (NPC) дрожжей в сравнении с лягушкой *Xenopus*. Обозначения: CF — цитоплазматические филаменты; CP — цитоплазматические частицы; CRS — субъединицы цитоплазматического кольца; TR — тонкое кольцо; ONM — наружная ядерная мембрана; IF — внутренние филаменты; MR — мембранное кольцо; Т — транспортер; ISD — домен внутренней спицы; INM — внутренняя ядерная мембрана; NR — кольцо нуклеоплазмы; В — корзина. Черным цветом обозначены компоненты, которые наблюдали методом feSEM (разновидность сканирующей электронной микроскопии), хотя корзина была показана раньше другими методами, внутренние филаменты нуклеоплазмы остаются спекулятивны. Масштабный отрезок 50 нм (Kiseleva et al., 2004).

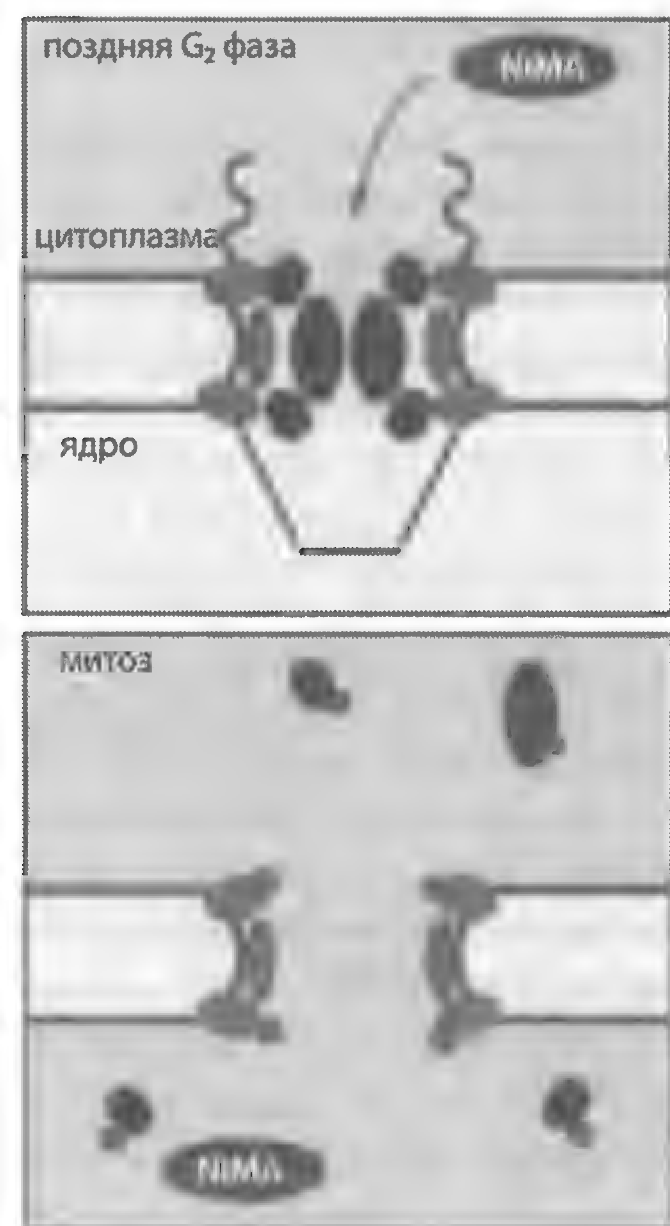


Рис. 93. Частичная разборка комплекса ядерной поры (NPC) в процессе митоза у *Aspergillus nidulans*. Схема NPC в позднюю G_2 фазу и митоз. В поздней G_2 фазе Нп с фенилаланил-глициновыми повторами (черным) занимают центральный канал NPC, ограничивая пассивную диффузию и облегчая активный транспорт Накопление и активация киназы NIMA — (*n*ever *i*n *m*itosis) в процессе G_2 запускает выход Нп из центрального канала, в то время как периферические Нп (серым) остаются связанными с ядерной оболочкой. Показано предполагаемое фосфорилирование Нп NIMA-киназой. Открытие центрального канала NPC снижает активный транспорт и разрешает пассивный транспорт через NPC, таким образом, тубулин получает доступ в ядро в процессе митоза (De Souza, Osmani. 2007).

мой. На периферии ядра происходит взаимодействие Яп с хроматином, мРНК, в то же время *центромеры*, *теломеры* и нетранскрибируемый хроматин кластеризуются и прикрепляются вдалеке от пор. В целом, ядерная оболочка грибов по структуре и функциям подобна таковой у других эукариотических организмов. Главное отличие грибов от других эукариотических организмов — в сохранении целостности ядерной оболочки во время деления ядра (митоз, мейоз).

Внутренняя организация ядер зависит от стадии клеточного цикла и отражает локализацию мест для транскрипции тРНК и рРНК, сборки рибосом и репарации ДНК. Ядерный матрикс или нуклеоплазма имеет сложную упорядоченную и многокомпонентную структуру и состоит из структурных белков. В отличие от клеток животных у дрожжей отсутствуют ядерные промежуточные фибриллярные белки *ламины,* образующие ригидную сеть под внутренней ядерной мембраной. Нуклеолемма стабилизирует форму ядра и фиксирует положение интерфазного хроматина.

9.2.2. Хроматин и хромосомы

В нуклеоплазме локализованы молекулы ДНК, несущие основную генетическую информацию о клетке. ДНК составляет основную часть хроматина — главного компонента ядра. Число молекул ДНК, приходящееся на одну клетку, является важным таксономическим признаком организма. Хроматин (для интерфазных ядер) в переводе «окрашенный материал» состоит из суперскрученной ДНК, связанной с гистонами (белки основной природы). Хроматин может находиться в разной степени конденсации: в интерфазе (интерфазные ядра) хроматин, участвующий в репликации или транскрипции, находится в деконденсированной форме (эухроматин или активный хроматин), а гетерохроматин, генетически неактивный, образует плотные скопления «хромоцентры» конденсированного хроматина; во время деления ядра (митоз, мейоз) хроматин находится в конденсированном состоянии и образует хромосомы.

9.2.2.1. Нуклеиновые кислоты. Транскрипция. Трансляция

Нуклеиновые кислоты (НК) представляют собой линейные полиэлектролиты, состоящие из мономеров-мононуклеотидов, которые включают азотистое основание (пуриновое или пиримидиновое), пентозу и остаток фосфорной кислоты. Основу ДНК составляют дезоксирибоза и азотистые основания: аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц) и тимин (Т). В состав РНК входят рибоза и те же основания за исключением тимина, который заменен урацилом (У).

Характерной особенностью дрожжей является отсутствие минорных оснований (6-метиладенина, 1-метилгуанина, 5-метилцитозина, 5-оксиметилцитозина), встречающихся в следовых количествах у высших эукариот в тРНК и рРНК. Количество нуклеотидов четырех типов, входящих в состав ДНК, может охарактеризовать видовую принадлежность организма. Доказано, что соотношение (А+Т)/(Г+Ц) представляет собой показатель специфичности ДНК и может быть использовано при установлении положения, занимаемого организмом в общей классификации организмов. Так, для *S. cerevisiae* величина (А+Т)/(Г+Ц) соответствует 1,80–1,79.

Последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи составляет первичную структуру нуклеиновых кислот. Вторичная структура ДНК представляет собой по модели Дж. Уотсона и К. Крика правозакрученную двойную спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Отдельные участки одиночной цепи РНК также образуют вторичную структуру в виде спирализованных петель — «шпилек», за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и Г-Ц. Взаимодействие спирализованных элементов вторичной структуры РНК образует третичную структуру. Третичная структура ДНК — упаковка молекулы ДНК в хромосому.

Первичная, вторичная и третичная структуры РНК и ДНК для всех эукариотических организмов построены по одному принципу.

Процессы хранения информации и синтеза белка у эукариот разобщены в пространстве и во времени. Транскрипция протекает в клеточном ядре путем построения комплементарной цепи матричной РНК на развернутой цепи ДНК. РНК-предшественник далее отделяется от ДНК и подвергается процессингу, в результате чего вырезаются неинформативные участки РНК и образуется функциональная молекула мРНК, которая переносится в цитоплазму через поры ядерной мембраны в виде рибонуклеинового комплекса с белками. Трансляция протекает с участием мРНК и тРНК в цитоплазме на рибосомах. Здесь последовательность нуклеотидов переводится в линейную последовательность аминокислот полипептидной цепи белка.

9.2.2.2. Гистонные белки в формировании нуклеосом. Микрофибриллы хроматина

Основным белковым компонентом хроматина, ответственным за компактизацию ДНК в клеточном ядре, являются гистоны. Они синтезируются в цитоплазме синхронно с репликацией ДНК в ядре (во время S фазы клеточного цикла) и сразу перемещаются в ядро. Существует 5 типов гистонов. В ядре каждой клетки присутствует несколько десятков млн молекул каждого типа гистонов, а общая масса гистонов примерно равна содержанию ДНК. Аминокислотные остатки лизина, аргинина и концевые аминогруппы гистонов могут модифицироваться: ацетилироваться, фосфорилироваться, метилироваться или взаимодействовать с белком убиквитином (негистоновый белок). Модификации бывают обратимыми и необратимыми, они изменяют заряд и конформацию гистонов, а это влияет на взаимодействие гистонов между собой и с ДНК. Активность ферментов, ответственных за модификации, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла (см. далее). Модификации гистонов делают возможными конформационные перестройки хроматина, то есть гистоны участвуют в эпигенетической регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация.

Четыре гистона Н2А, Н2В, Н3 и Н4 образуют октамерный белковый комплекс $(Н2А, Н2В, Н3, Н4)_2$, который называют нуклеосомный кор (от англ. nucleosome core) (рис. 94А).

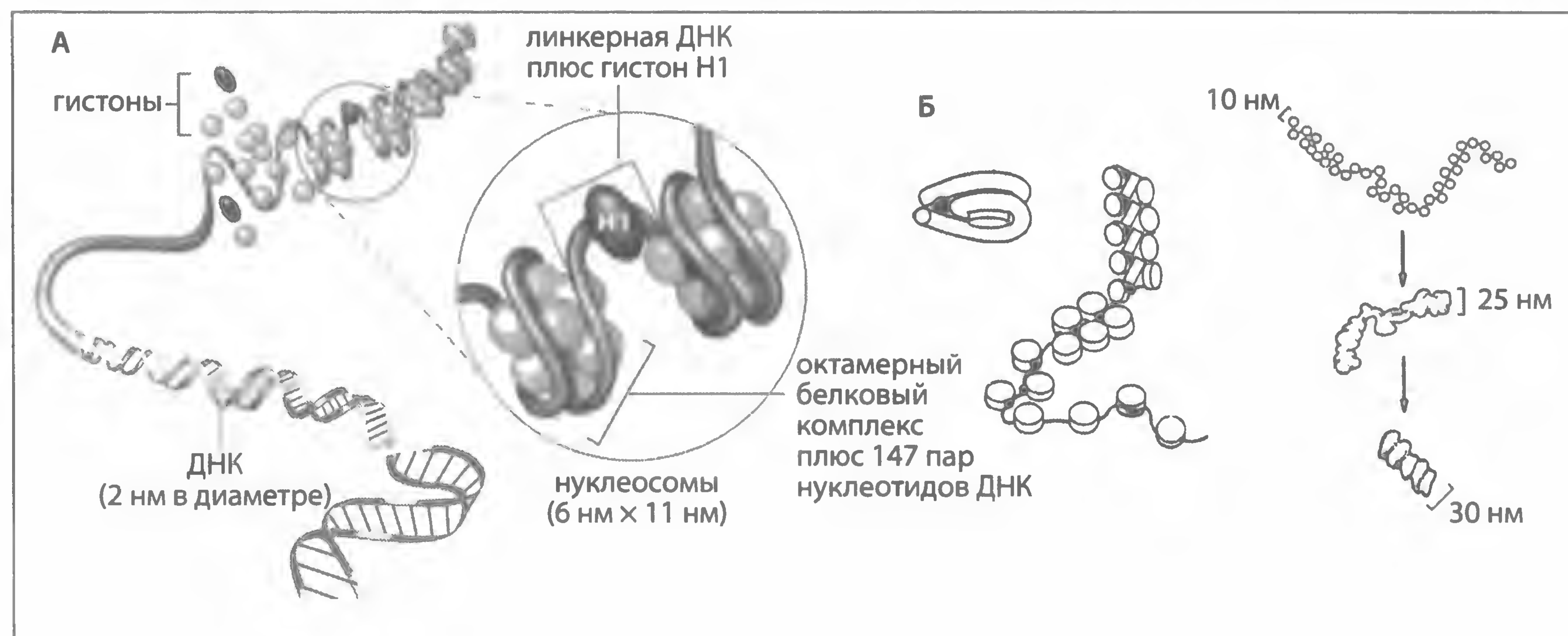


Рис. 94. Структура хроматина.
А. Упаковка двуспиральной молекулы ДНК в нуклеосомы с участием гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4 (слева). Две нуклеосомы, связанные между собой линкерной ДНК и гистоном Н1 (справа)
Б. Разные уровни упаковки хроматина. Модель нуклеосомы (вверху слева) с ассоциированными белками (черный мячик). В середине — модель «бусы-на-нити», формирующие хроматин. Справа складывание «бусы-на-нити» в 30 нм фибриллу (Perez-Martin, 1999).

Молекула ДНК «накручивается» на поверхность гистонового октамера, совершая 1,75 оборота (около 147 пар нуклеотидов). Такой комплекс гистоновых белков с ДНК в диаметре 7 нм служит основной структурной единицей хроматина, её называют *нуклеосома.* Сегменты ДНК, которые находятся между нуклеосомными частицами, называют линкерными (т.е. соединяющими) ДНК. В среднем сегмент линкерной ДНК между соседними нуклеосомами составляет 60 пар нуклеотидных остатков. Молекулы пятого гистона Н1 связываются с линкерной ДНК и защищают эти участки от действия нуклеаз.

В эухроматине хроматин очень рыхлый, свободный от гистона Н1, образует типичную «нитку жемчуга» (рис. 94Б). Н1 называют линкерным гистоном. Он вызывает конденсацию хроматина, с увеличением доли Н1 хроматин становится все более компактным. При этом сначала образуются нуклеофиламенты с поперечным диаметром 10 нм, при продолжающемся уплотнении возникают различные дополнительные структуры, например, *соленоиды* (суперспиральные структуры с 6 нуклеосомами на виток суперспирали). Наконец, образуется нитевидная структура примерно 30 нм толщиной —*хроматиновая фибрилла.* Двойная спираль ДНК, содержащаяся в хроматиновой фибрилле, будучи вытянутой, увеличивается в длину более, чем в 20 раз.

Еще более высокая степень упаковки хроматина встречается во время деления ядра при формировании хромосомы.

9.2.2.3. Хромосомы

Термин «хромосома» (от греческого chroma окрашенный и soma — тело) означает окрашенная структура. Этим термином принято называть нуклеопротеидные структуры в ядре эукариотической клетки, которые четко различимы в световом микроскопе во время деления ядра (митоза или мейоза). Совокупность признаков (число, размеры, форма и т.д.) полного набора хромосом, присущая клеткам данного биологического вида, называют *кариотипом* (*видовой кариотип*). Кариотип гриба невирулентного штамма *Nectria haematococca* представляет собой 9 хромосом размером от 0,1–1,5 мкм (рис. 95), а вирулентный штамм имеет

дополнительно десятую очень маленькую В-хромосому. Характерной особенностью, обнаруженной у некоторых видов грибов, является наличие мелких, так называемых В-хромосом. В отличие от хромосом видового кариотипа (хромосомы основного набора, А-хромосомы) число В-хромосом непостоянно и может быть различным у штаммов одного и того же вида. Наличие В-хромосом не обязательно для обеспечения жизнедеятельности клетки, но они выполняют функцию адаптации к внешним условиям. Например, у фитопатогенных видов эти хромосомы контролируют факторы вирулентности и штаммы, лишённые их, способны только к сапротрофному питанию.

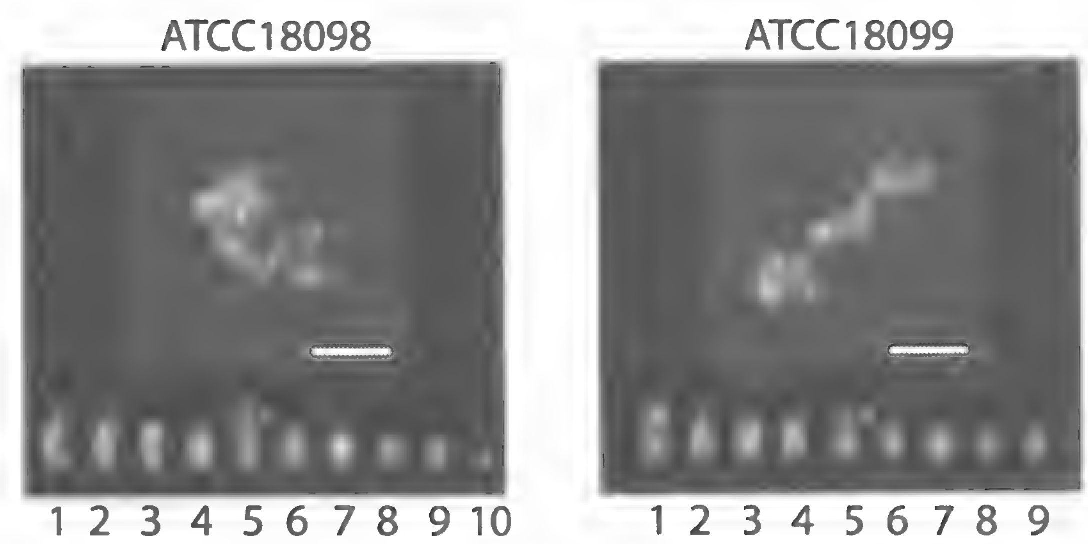


Рис. 95. Цитологические кариотипы патогенного ATCC18098 и непатогенного ATCC18099 штаммов *Nectria haematococca* MPI с митотическими метафазными хромосомами. Образцы окрашивали DAPI. Спредирование хромосом ядра (в квадратах вверху) и ряд хромосом, ранжированных по длине (нижний ряд). Стрелка указывает на участок рДНК, который образует «вторичную перетяжку» на хромосоме 5 у обоих штаммов. Масштабный отрезок 2 мкм (Mahmoud, Taga, 2012).

Отдельные хромосомы одного набора содержат различные части генетической информации и, как правило, имеют разный облик. Хромосомы отличаются по следующим признакам: длине хромосомы, положению центромеры, наличию или отсутствию области ядрышкового организатора и гетерохроматиновых участков (рис. 95).

Положение хромосом в ядре зависит от обратимых взаимодействий хромосомальных маркеров с полярным телом веретена (см. далее) и внутренней ядерной мембраной. Центромерные участки хромосом удерживаются в кластере в интерфазе около ПТВ. благодаря коротким микротрубочкам.

Число однородных хромосомных наборов в ядре определяет степень его *плоидности*. Ядра с одинарным набором хромосом являются гаплоидными (число хромосом равно n). В табл. 5 представлены сведения о гаплоидном наборе хромосом для некоторых грибов. Число хромосом колеблется от 2 до 28, у большинства видов — от 10 до 12. Размер хромосом у грибов также значительно меньше, чем у других эукариот. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* имеется 16 хромосом, но каждая из них примерно в 5 раз меньше, чем «хромосома» бактерии *Escherichia coli* и всего в 4 раза превышает размер ДНК бактериофагов группы Т.

Таблица 5

Гаплоидный набор хромосом в ядрах разных видов грибов

Вид гриба	n
Agaricus bisporus	14
Allomyces arbusculus	8
Aspergillus nidulans	8
Candida utilis	2
Neurospora crassa	14
Pleurotus ostreatus	11
Pleurotus pulmonarius	8
Saccharomyces cerevisiae	16

Количество ДНК на гаплоидный геном у грибов составляет от 0,015 пг (у *S. cerevisiae*) до 8,3 пг (у зигомицетов рода *Entomophaga*), то есть колеблется более, чем в 500 раз (у высших растений разница в содержании ДНК составляет менее 100 раз). По числу пар нуклеотидов (п.н.) наименьший геном (9,7 млн п.н.) имеет патоген хлопчатника *Eremothecium gossypii*. Среди эукариот меньший размер генома известен только у некоторых водорослей, являющихся эндосимбионтами. Для базидиомицетов характерные размеры генома составляют от 0,023 пг (или 21 млн п.н.) у вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) до 0,1 пг (90 млн п.н.) у плютея оленьего (*Pluteus cervinus*).

Различные негистоновые белки образуют нитевидный скелет хромосомы, от которого отходят по всем направлениям хроматиновые фибриллы в виде боковых петель непрерывной нуклеосомной нити — молекулы ДНК с гистонами. 20 петель образуют минидиски. Большое число минидисков укладывается в стопку, составляя хромосому.

Кинетохоры (белковая структура на центромерах хромосом, к которой крепятся волокна веретена деления во время деления ядра) играют важнейшую роль при сегрегации хромосом для последующего разделения родительской клетки на две дочерние. Кинетохоры подразделяют на две области — внутреннюю, крепко связанную с центромерной ДНК, и внешнюю, взаимодействующую с микротрубочками веретена деления. В начале митоза быстро растущие и тут же распадающиеся микротрубочки активно «ощупывают» нуклеоплазму клетки в поисках кинетохоров. С ходом эволюции и усложнением организмов число микротрубочек, закрепляющихся на единичном кинетохоре, по-видимому, возрастало: у дрожжей вида *S. cerevisiae* к кинетохору крепится одна микротрубочка, у *Schizosaccharomyces pombe* — от двух до четырёх, у мушки *Drosophila melanogaster* от четырёх до шести, у млекопитающих — от 20 и более. Структурно кинетохоры состоят из множества белков, их набор различен у разных видов, но многие из них гомологичны. Основными белками, входящими в состав кинетохоров, являются белки, связывающие их с ДНК.

9.2.2.4. Негистоновые белки

В ядре эукариотической клетки присутствуют сотни самых разнообразных ДНК-связывающих негистоновых белков. Каждый белок комплементарен определённой последовательности нуклеотидов ДНК (сайту ДНК). Группа негистоновых белков высоко гетерогенна и включает *структурные ядерные белки*, множество *ферментов* и *факторов транскрипции*, связанных с определенными участками ДНК и осуществляющих регуляцию генной экспрессии и других процессов. К факторам транскрипции относят семейство сайт-специфических белков типа «цинковые пальцы». Каждый «цинковый палец» узнаёт определённый сайт, состоящий из 5 нуклеотидных пар. Другое семейство сайт-специфических белков — гомодимеры. Фрагмент такого белка, контактирующий с ДНК, имеет структуру «спираль-поворот-спираль». К группе структурных и регуляторных белков, которые постоянно ассоциированы с хроматином, относят белки высокой подвижности (HMG-белки — от англ. high mobility group proteins). Они имеют молекулярную массу менее 30 кДа и характеризуются высоким содержанием заряженных аминокислот. Благодаря небольшой молекулярной массе HMG-белки обладают высокой подвижностью при электрофорезе в полиакриламидном геле. К негистоновым белкам принадлежат также ферменты репликации, транскрипции и репарации. При участии структурных, регуляторных белков и ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК, нить нуклеосом преобразуется в высококонденсированный комплекс белков и ДНК. Образованная структура в 10000 раз короче исходной молекулы ДНК.

9.2.3. Ядрышко

Ядрышко находится внутри ядра и не имеет собственной мембранной оболочки, однако хорошо различимо под световым и электронным микроскопом. У грибов в ядре чаще всего одно ядрышко. Основной функцией ядрышка является синтез рибосом. В геноме клетки имеются специальные участки. так называемые ядрышковые организаторы, содержащие гены рибосомной РНК (рРНК), вокруг которых и формируются ядрышки. В ядрышке происходит синтез рРНК РНК полимеразой I, ее созревание, сборка рибосомных субчастиц. В ядрышке локализуются белки, принимающие участие в этих процессах. Следует отметить, самая высокая концентрация белка в клетке наблюдается именно в ядрышке. В этих структурах локализовано около 600 различных белков, причем считается. что лишь небольшая их часть действительно необходима для осуществления ядрышковых функций, а остальные попадают туда неспецифически. Под электронным микроскопом в ядрышке выделяют несколько субкомпартментов. Фибриллярные центры окружены участками плотного фибриллярного компонента, где и происходит синтез рРНК. Снаружи от плотного фибриллярного компонента ядрышка расположен гранулярный компонент, представляющий собой скопление созревающих рибосомных субчастиц.

9.3. Полярное тело веретена (ПТВ)

9.3.1. Общие сведения

ПТВ — также, как и ядрышко, немембранная органелла грибов, которая является главным местом образования микротрубочек. ПТВ — грибной эквивалент центросомы клеток животных. У почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* оно выглядит под электронным микроскопом, как электронно-плотная многослойная структура, которая встроена в ядерную оболочку. γ-Тубулиноподобные белки образуют комплекс и локализованы в наружной и внутренней пластинках ПТВ. Помимо основной функции (рис. 96), как центра образования микротрубочек, ПТВ опосредованно участвует в сегрегации хромосом, положении ядер в клетке, кариогамии и ориентации веретена деления ПТВ является местом восприятия сигналов MEN (mitotic exit network) пути и, возможно. участвует в формировании мембран проспор в сумке *S. cerevisiae.*

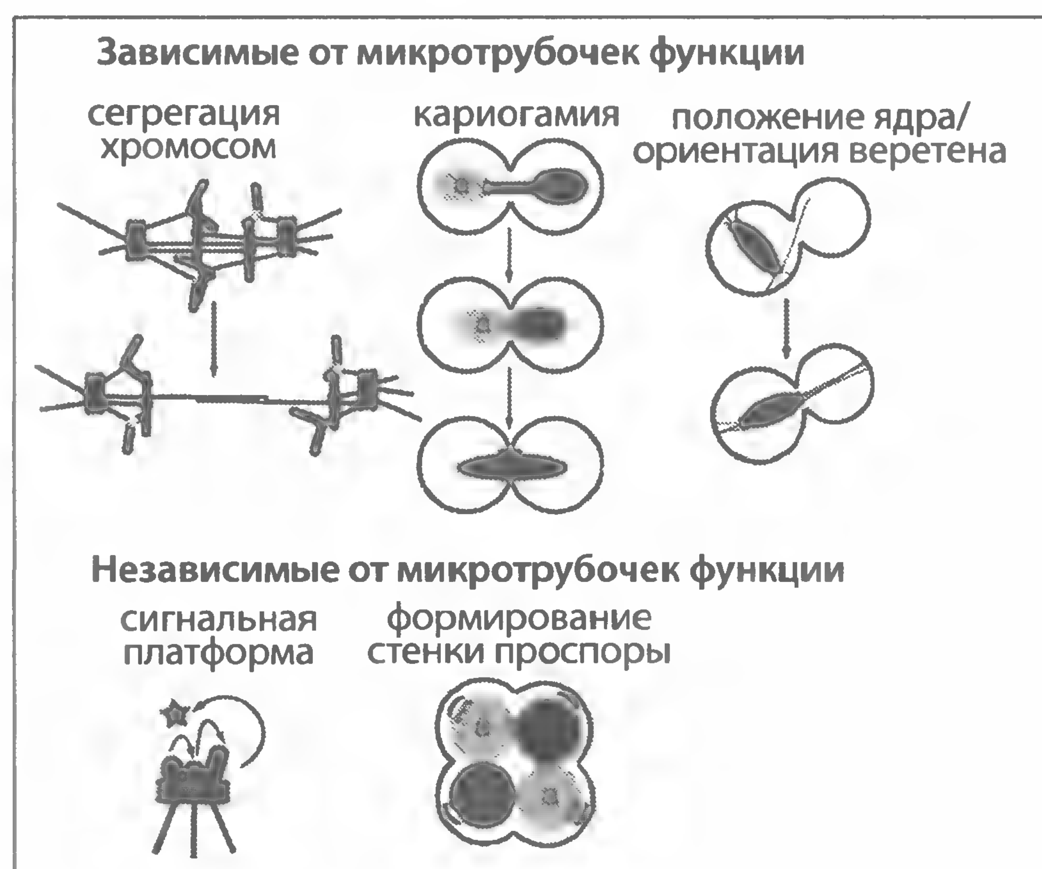


Рис. 96. Функции ПТВ
ПТВ дрожжей необходимо для нескольких микротрубочко-зависимых функций, включающих мейотическую и митотическую сегрегацию хромосом, кариогамию и позиционирование ядра/ориентация веретена деления. Существуют, по крайне мере. две микротрубочко-независимые функции: формирование мембран проспор и сигнальной платформы для MEN-пути. Не показана роль ПТВ в цитокинезе (Jaspersen, Winey, 2004).

9.3.2. Структура ПТВ

Структура ПТВ была тщательно изучена с помощью электронной микроскопии у ряда дрожжей (*Schizosaccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *S. japonicus)* и мицелиального гриба (*Ashbya gossypii*). Показано, что ПТВ представляет собой трехслойную немембранную структуру, которая в случае неделящегося ядра находится в цитоплазме, плотно примыкает к ядерной оболочке и принимает участие в формировании цитоплазматических микротрубочек (МТ), а во время деления ядра (митоз, мейоз) встраивается в ядерную оболочку и принимает участие в формировании веретена деления.

ПТВ *S. cerevisiae* представляет собой цилиндрическую органеллу, которая состоит из трех дисков или пластин темноокрашенного материала (рис. 97): наружная пластина, обращена к цитоплазме и связана с цитоплазматическими микротрубочками, внутренняя пластина обращена к нуклеоплазме и связана с ядерными микротрубочками, центральная пластина захватывает ядерную мембрану. С одной стороны центральная пластина ПТВ контактирует с электронноплотным районом ядерной оболочки, названным полумостом (half-bridge). Это место сборки нового ПТВ.

Детальное исследование ПТВ показало, что оно состоит из множества взаимосвязанных слоев. В дополнение к трем известным слоям, два дополнительных слоя названные первым и вторым промежуточными слоями (внутренние слои 1, 2, IL1, IL2), наблюдали между наружной и центральной пластинкой (рис. 97). Центральная пластинка и внутренний слой 2 состоят из отдельных высокоупорядоченных слоев. От центральной пластины отходят два отростка в виде крючка, что напоминает заякоривание ПТВ в ядерной мембране.

Тщательный анализ размера и структуры ПТВ у *S. cerevisiae* показал, что ПТВ динамичная органелла. В гаплоидных клетках ПТВ растут в диаметре от 80 нм в стадии G_1 клеточного цикла до 110 нм в митозе, хотя высота ПТВ (расстояние от внутренней до наружной пластины) остается постоянной и составляет примерно 150 нм. Диаметр ПТВ увеличивается с увеличением содержания ДНК. В диплоидной клетке диаметр ПТВ составляет 160 нм, а в тетраплоидной — в два раза больше. Увеличение диаметра ПТВ увеличивает его способность к образованию микротрубочек, что является важным для сегрегации хромосом. Как регулируется размер ПТВ, пока неизвестно. Структура ПТВ изменяется в стадии G_1 при подготовки к удвоению и созреванию и в процессе второго деления мейоза при инициации формирования спор.

ПТВ является единственным местом зарождения микротрубочек у многоядерного мицелиального аскомицетного гриба, близкого родственника почкующимся дрожжам *Ashbya gossypii*. Анализ ПТВ *A. gossypii* с помощью электронной микроскопии выявил многослойную структуру, сходную с ПТВ *S. cerevisiae,* но с выраженными различиями на цитоплазматической стороне. До 6 перпендикулярных и тангентальных цитоплазматических МТ отходят от наружной пластинки. Перпендикулярные и тангентальные цитоплазматические МТ соответствуют коротким МТ, ассоциированным с кортексом. Каждое ПТВ порождает свой собственный пучок цитоплазматических микротрубочек, и отсутствие перекрытия пучков МТ соседних ядер объясняет автономную осцилляцию ядер, наблюдаемую в многоядерной гифе *A. gossypii.*

9.3.3. Компоненты ПТВ

Молекулярная масса диплоидного ПТВ, включая микротрубочки и ассоциированные с микротрубочками белки, достигает 1–1,5 ГДа, где сердцевина ПТВ составляет 0,3–0,5 ГДа. ПТВ содержат, по крайней мере, 30 разных белков. Однако только 17 компонентов ми-

тотического ПТВ идентифицировано к настоящему времени. ПТВ образовано структурными белками, γ-тубулиноподобными белками и компонентами MEN. Делеция или мутация гена, контролирующего синтез любого из этих белков, приводит к массовым дефектам структуры и функции ПТВ: арест клеточного цикла, однополюсное веретено, дефекты сборки ПТВ, мутации регуляторов кариогамии, нарушение положения ядер и др. Идентифицированные белки ПТВ обозначены на рис. 97.

Белки центра (core) ПТВ

Spc42 — особый спирально закрученный белок, который образует центр ПТВ. Примерно 1000 молекул Spc42 собрано в триммеры димеров Spc42, формируя гексагональную решетку, видимую на крио-ЭМ в слое IL2. Суперэкспрессия Spc42 приводит к формированию суперпластины, необходимой для действия *cis*- и *trans*-факторов, которые задействованы в удвоении ПТВ на стадии G_1 клеточного цикла.

На N-конце белок Spc42 связан с Spc110 и Spc29, двумя другими спирально закрученными белками, которые локализованы на ядерной стороне ПТВ. C-Концы Spc110 локализованы в центральной пластинке и связаны с Spc29 и кальций-связывающим белком кальмодулином (Cmd1). У дрожжей — особая функция кальмодулина в ПТВ — предположительно регуляция связывания Spc110 с Spc29. Белок Spc29 является линкером между внутренней и центральной пластинкой и связан с Spc42 и Spc110, хотя по некоторым данным Spc110 может непосредственно взаимодействовать с Spc42.

N-Конец Spc110 локализован во внутренней пластинке и связан непосредственно с Spc98, одним из двух похожих γ-тубулин-связанных белков, необходимых для образования микротрубочек.

C-Конец Spc42 обращен в цитоплазму и связан с C-концом Cnm67. Сходно с Spc110, спирально закрученный участок Cnm67 способствует его димеризации и функционированию между внутренними слоями IL2 и IL1. N-Конец белка Cnm67 связан с наружной пластиной ПТВ и белком Nud1, необходимым для выхода из митоза. Другой спирально закрученный белок Spc72 также обнаружен в наружной пластинке. Spc72 связан с Nud1 и с компонентами γ-тубулинового комплекса.

Другие белки ПТВ

По крайней мере, 9 компонентов сигнального пути сети MEN, которые контролируют положение веретена и некоторые поздние события митоза, связаны с ПТВ в процессе митоза. Локализация белков MEN в ПТВ важна для их функционирования.

Белки, которые регулируют положение веретена деления, могут быть также обнаружены в ПТВ. Динеин, а также фракция кортикально-связанного белка Kar9 локализованы в ПТВ и связаны с микротрубочками.

9.3.4. Удвоение ПТВ

ПТВ не синтезируется заново. Оно удваивается каждый раз на стадии G_1 клеточного цикла. Способ удвоения ПТВ может быть разделен на три этапа: (1) удлинение полумоста и отложение сателлитного материала, (2) растяжение сателлита в двойную пластину и сползание с полумоста, (3) встраивание двойной пластины в ядерную оболочку и сборка внутренней пластины. Вслед за удвоением ПТВ мост их связывающий разрывается, и ПТВ перемещаются на противоположные стороны ядерной оболочки (4) (рис. 98).

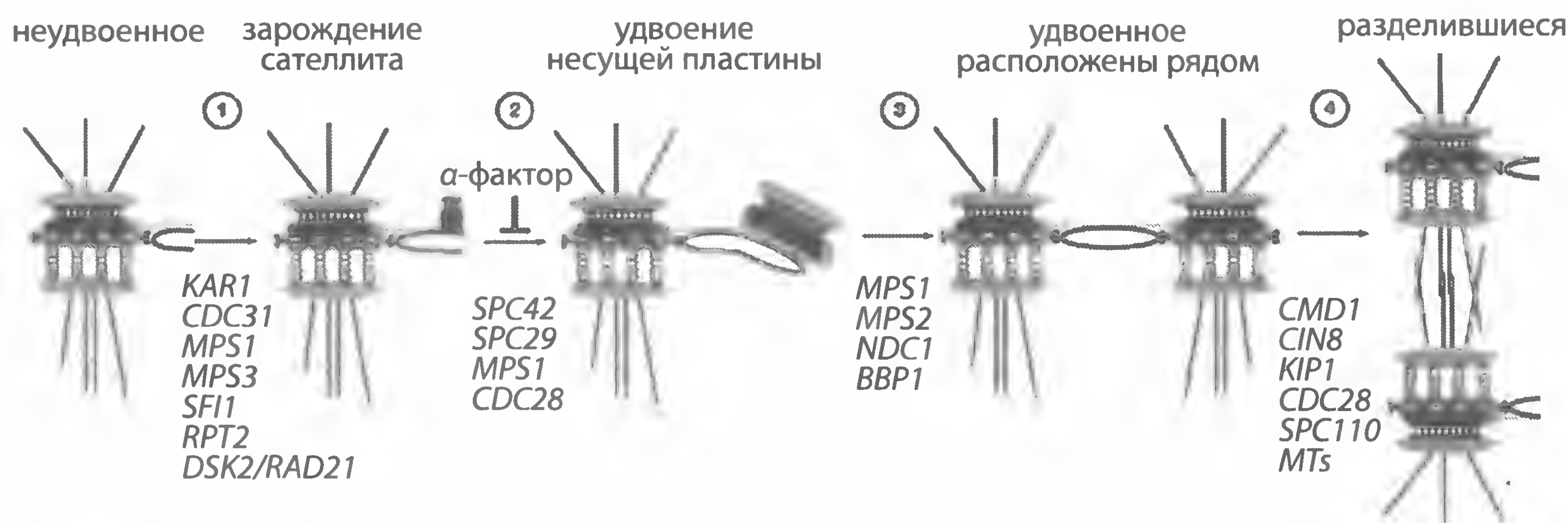


Рис. 98. Путь удвоения ПТВ.
Протекает в три этапа: (1) удлинение ядерной оболочки в месте локализации ПТВ (полумост) и отложение сателлитного материала, (2) растяжение сателлита и (3) встраивание двойной пластины в ядерную оболочку и сборка внутренней пластины. Вслед за удвоением ПТВ мост (участок ядерной оболочки), связывающий два ПТВ, рвется и ПТВ перемещаются на противоположные стороны ядерной оболочки (4) (Jaspersen. Winey, 2004).

9.3.5. Мейотическое и митотическое ПТВ

Диплоидные клетки дрожжей *S. cerevisiae* подвергаются двум делениям мейоза (см далее) с образованием гаплоидного потомства в условиях азотного голодания. В процессе деления происходит сегрегация ДНК, и потомство получает одну копию всех 16 хромосом. Мейотическое веретено аналогично по структуре митотическому веретену и образуется в процессе первого деления мейоза. Морфологически ПТВ веретена деления мейоза I идентичны ПТВ митотического веретена деления, но крупнее по диаметру. Предположительно, все компоненты ПТВ важны для митотического ПТВ. Между делениями мейоза ПТВ должно удвоиться, так как формируются два биполярных веретена в стадии мейоза II. Любопытно, что удвоение происходит в отсутствие ядерного деления, то есть два мейотических веретена мейоза II формируются в одном ядре. Вслед за последовательным удвоением и формированием веретена мейоза II ПТВ подвергаются морфологическим изменениям. Белок наружной пластины Spc72 удаляется и заменяется на два мейотических белка ПТВ, Mpc54 и Spo21/Mpc70, которые формируют мейотическую пластину.

9.4. Клеточный цикл

Клеточный цикл — период существования клетки от момента её образования путем деления материнской клетки до собственного деления или гибели. Клеточный цикл состоит из нескольких фаз (рис. 99). В первой фазе (G_1) на «старте» клетка растет и увеличивается в размерах, в этот период происходит активный синтез белков, углеводов и липидов, активно функционируют циклы метаболических реакций, поставляющих АТФ, восстановленные коферменты и т.д. (см. главу Метаболизм). Достигнув определенного размера, клетка вступает в следующую фазу (S), когда происходит синтез ДНК и клетка удваивает свой генетический материал (репликация ДНК). Во время следующей фазы (G_2) клетка проверяет, за-

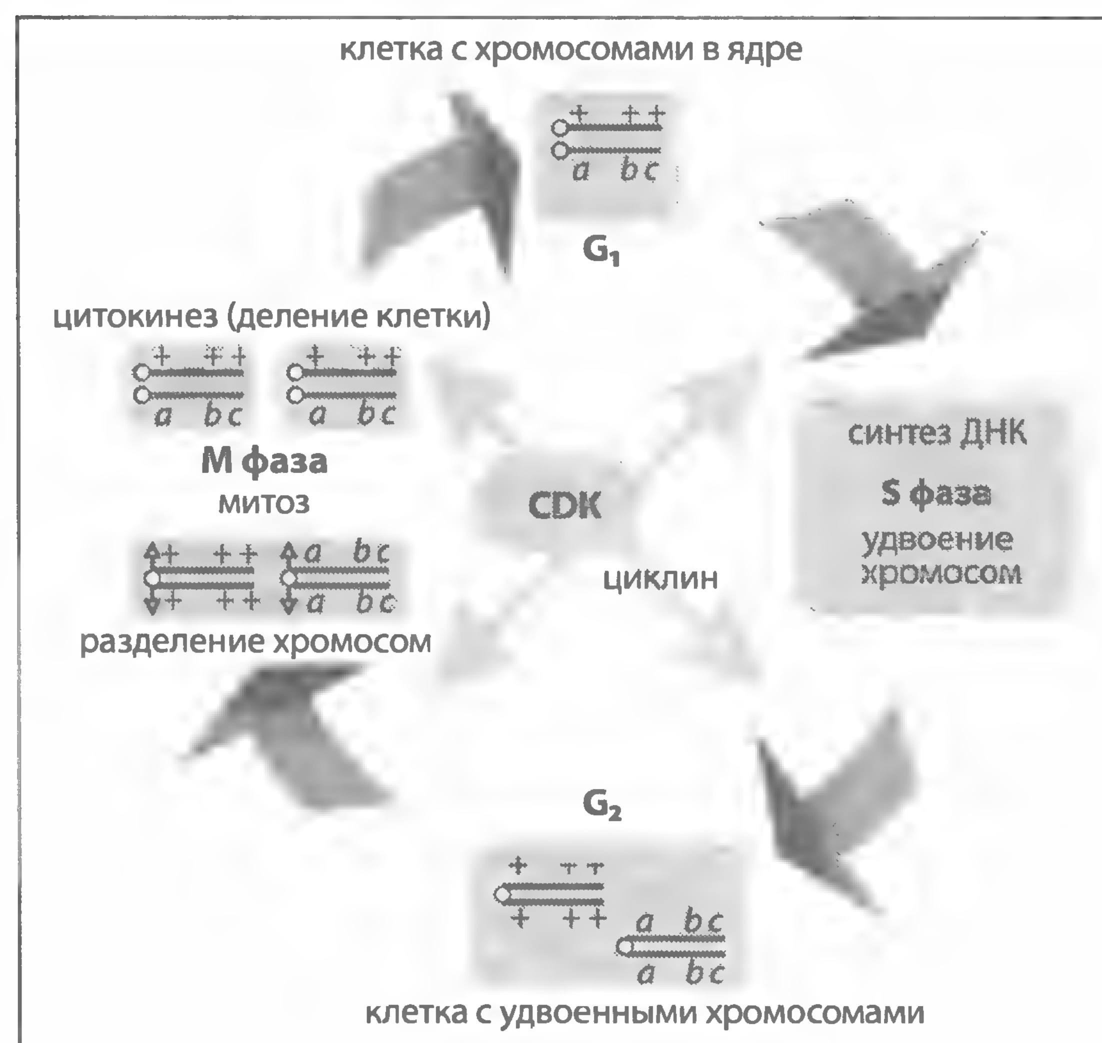


Рис. 99. Фазы клеточного цикла. В первой фазе (G_1) клетка растет. Достигнув определенного размера, она вступает в фазу синтеза ДНК (S), когда происходит удвоение хромосом. В процессе следующей фазы (G_2) клетка готовится к делению. В процессе митоза (M) хромосомы разделяются по дочерним ядрам, и за кариокинезом следует цитокинез. Это завершает клеточный цикл, и дочерние клетки возвращаются в фазу G_1. События клеточного цикла находятся под контролем циклин-зависимой протеинкиназы (CDK, англ. cyclin dependent kinase) циклинзависимой протеинкиназы. Диаграмма описывает события (гетерозиготного) диплоида, но применима также к митотическому циклу гаплоидных клеток (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates /2001/press.html).

кончена ли репликация, и готовится к клеточному делению (митоз, М), в процессе которого происходит деление ядра (*кариокинез*) и цитоплазмы (*цитокинез*) и образуются две дочерние клетки. Особенности цитокинеза у грибов были рассмотрены в главе «Септы». Благодаря митозу каждая дочерняя клетка получает идентичный набор хромосом. После деления клетка оказывается в фазе G_1 и цикл завершается. Стадии G_1, S и G_2 относятся к интерфазе. Стадия G_0, которая может предшествовать стадии G_1, характерна для покоящихся неделящихся структур (хламидоспоры, склероции).

На молекулярном уровне переход от одной фазы цикла к другой регулируют белки- циклины и циклин-зависимые киназы. Молекулярные механизмы контроля клеточного цикла циклинами для дрожжей *S. cerevisiae* хорошо изучены и известны. Каждая клетка дрожжей *S cerevisiae* способна проходить через 25 клеточных циклов, после чего происходит накопление факторов старения и гибель клетки (репликативное старение). Клеточный цикл почкующихся дрожжей может быть суммирован следующим образом и те же основные принципы применимы к клеточным циклам всех эукариот:

- ✓ На «старте» в стадии G_1 интерфазы активируются транскрипция и трансляция циклинов стадии G_1, CLN1 и CLN2, эти белки взаимодействуют с циклин-зависимой протеинкиназой Cdc28, которая инициирует формирование почки и подготовку клетки к S-фазе. Далее протеинкиназа Cdc28 включает активацию генов, ответственных за синтез циклинов CLB5 и CLB6, которые стимулируют синтез ДНК (в S фазе).
- ✓ К концу S фазы запускается синтез «поздних» циклинов CLB1 и CLB2, которые выключают транскрипцию генов «ранних» циклинов. По мере синтеза происходит накопление «поздних» циклинов, которые взаимодействуют с киназой Cdc28 и облегчают переход от G_2 к фазе М.
- ✓ Инициация митоза у клеток эукариот регулируется каскадом фосфорилирования, кульминация которого — активация фактора, способствующего митозу (mitosis promoting factor, MPF).
- ✓ MPF состоит как минимум из двух субъединиц: циклин-зависимой киназы Cdc28/Cdc2 у дрожжей, Cdk1 у высших эукариот и циклин-регуляторной субъединицы В-типа.
- ✓ В конце митоза в телофазе активируется протеаза, которая деградируют митотические циклины и цикл завершается.

Транскрипционный контроль клеточного цикла, осуществляемый парами циклин-зависимой протеинкиназы — циклина, основан на фосфорилировании факторов активации транскрипции генов, кодирующих структурные белки (рис. 99). Таким образом, пары циклины — циклин-зависимые киназы координируют такие важные события в жизни клетки, как формирование веретена деления, деление ядра, разделение клетки.

У всех эукариотических организмов продвижение клеточного цикла контролируют серии контрольных точек цикла (checkpoints). Например, в контрольной точке сборки веретена деления ингибируется наступление анафазы, пока все кинетохоры не прикрепятся к микротрубочкам веретена. Контрольные точки обеспечивают последовательное прохождение стадий клеточного цикла, предотвращают прогрессию клеточного цикла при дефектах в репликации ДНК, целостности гена или нарушении функции полярных тел веретена. При перечисленных выше нарушениях происходит арест клеточного цикла.Мицелиальные грибы растут за счет роста и деления верхушечной клетки (см. главу «Апикальный рост»). Клеточный цикл мицелиальных грибов завершается в течение относительно короткого времени, по сравнению с типичным циклом клеток млекопитающих, который занимает примерно 24 ч. Для *Aspergillus nidulans* один клеточный цикл занимает около 2 ч, хотя ядро в состоянии митоза находится всего 5 мин.

У мицелильного аскомицетного гриба *Podospora anserina* мицелий растет в течение 25 суток. Если учитывать, что клеточный цикл занимает примерно 2 ч, то за 25 суток верхушечные клетки проходят примерно через 300 циклов. Далее происходит остановка роста и гибель верхушечной клетки. Рост многих мицелиальных грибов при оптимальных условиях продолжается десятки лет.

9.5. Особенности митоза у грибов

Быстрые ядерные деления у грибов (3–20 мин) контролируются аппаратом клеточного цикла и координированы с ростом и развитием. В отличие от высших эукариот, у большинства грибов **митоз закрытый** и ядерная оболочка сохраняется на протяжении всего клеточного цикла (за исключением *Ustilago maydis*). Поэтому у многих грибов ядерная оболочка может также рассматриваться как важная часть митотического аппарата. У грибов центр организации микротрубочек митотического веретена — **полярные тела веретена** (см. раздел 9.3.1).

Рассмотрим основные морфологические черты неделящегося (в интерфазу) и делящегося ядра грибов (во время митоза).

В интерфазе с ядром связаны цитоплазматические микротрубочки, а ядерная ДНК неконденсирована. Такая структура ядра характерна и для клеток млекопитающих, хотя центросома млекопитающих находится в цитоплазме, а грибные полярные тела веретена локализованы в пределах ядерной оболочки. К фазе G_2 как ДНК, так и полярные тела веретена удваиваются, хотя разделения хромосом еще не произошло. Формирование веретена деления происходит при переходе стадии G_2 в стадию М, когда цитоплазматические микротрубочки начинают деполимеризовываться. При переходе ядра к митозу происходит изменение структуры ядерных пор. Более того, открытие ядерных пор у *Aspergillus nidulans* служит сигналом для входа в митоз.

В профазе происходит конденсация ДНК и начинается разделение полярных тел веретена. Когда они достигают полюсов деления, формируется веретено деления. Микротрубочки веретена берут начало из центра организации веретена (ПТВ) и формируют хромосомальное веретено деления и межполюсное веретено деления. Хромосомальное веретено деления состоит из микротрубочек, прикрепленных к кинетохорам хромосом, и принимает участие в разделении хромосом.

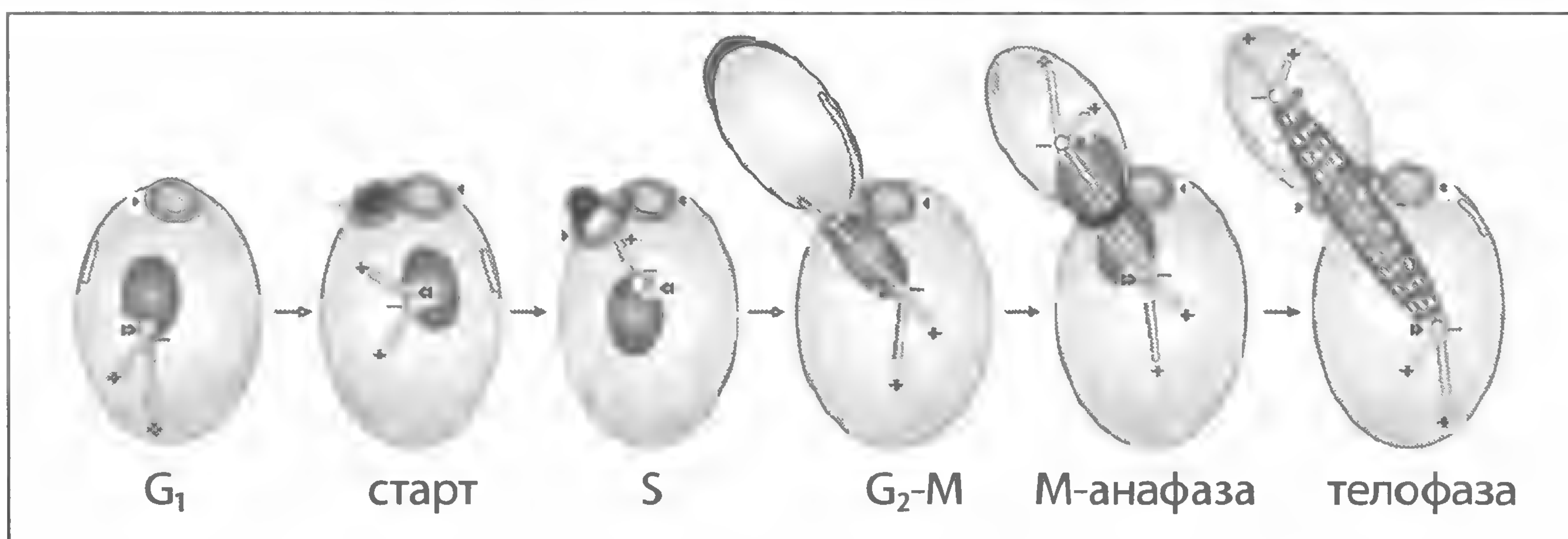


Рис. 100. Митоз у *Saccharomyces cerevisiae*. Клетки дрожжей подвергаются хорошо охарактеризованному митотическому клеточному циклу. В фазу G_1 новое септиновое кольцо формируется по соседству с рождающимся рубцом (◀ ▶). На границе G_1–S (старт) полярное тело веретена (ПТВ: ◀◀▶▶) удваивается. и через септиновое кольцо при участии актин-поляризованных секреторных везикул появляется почка (черным). Все микротрубочки, по-видимому, зарождаются у ПТВ, митоз является закрытым (ядерная оболочка не разрушается) (Gladfelter, Berman, 2009).

Затем наступает метафаза. Третья особенность митоза **у грибов – отсутствие четкой метафазной пластинки.** Метафазные хромосомы распределены группой в центральной части делящегося ядра и занимают 1/2–1/3 объема веретена деления. Хромосомы состоят из двух сестринских хроматид, связанных центромерными участками с помощью когезинов и уже удвоенных кинетохоров, к которым прикреплены микротрубочки веретена деления. Разделение хромосом начинается в анафазу А, когда происходит расхождение сестринских хроматид и их движение в сторону полярных тел веретена, а когезин, склеивающий центромерные участки хромосом, гидролизуется. Удлинение веретена и разделение ядерной оболочки перетяжкой происходит в анафазе В и телофазе соответственно. Финальная стадия митоза, телофаза, у разных грибов протекает по одному из трех сценариев:

- ✓ Ядерная оболочка делится перетяжкой, в результате чего образуется два дочерних ядра (у *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и многих других видов грибов рис. 100);
- ✓ Деление ядра, сопровождающееся внедрением только порции родительской нуклеоплазмы в каждое дочернее ядро, остаток (ядрышко с порцией нуклеоплазмы) отбрасывается и деградирует (*Aspergillus nidulans*);
- ✓ Формирование новой дочерней ядерной мембраны вокруг хромосом и небольшой порции нуклеоплазмы в дочерних ядрах, в то время как большая масса родительской нуклеоплазмы и их ядерная мембрана отбраковываются и деградируют (характерно для *Ustilago maydis,* рис. 101).

Первые два сценария характерны для многих грибов с закрытым митозом, который протекает по общей схеме, приведенной выше. Последний сценарий детально описан для *U. maydis* и является завершением открытого митоза. Остановимся на особенностях открытого митоза у *U. maydis* (рис. 101).

Он начинается с того, что в интерфазе (стадия G_2) материнская дрожжевая клетка формирует вырост, происходит удвоение ПТВ, которое в этот период занимает боковое положение и плотно примыкает к ядерной оболочке От ПТВ отходят цитоплазматические микротрубочки, ориентированные параллельно продольной оси делящейся клетки (рис. 101). В профазе удвоенное ПТВ перемещается на полюс ядра. Цитоплазматические микротрубочки, отходящие от него, на своем плюс конце образуют тесную связь с кортексом дочерней клетки при участии моторного белка динеина. От ПТВ внутрь ядра отходят внутриядерные микротрубочки, которые образуют связь с хромосомами. Динеин натяги-

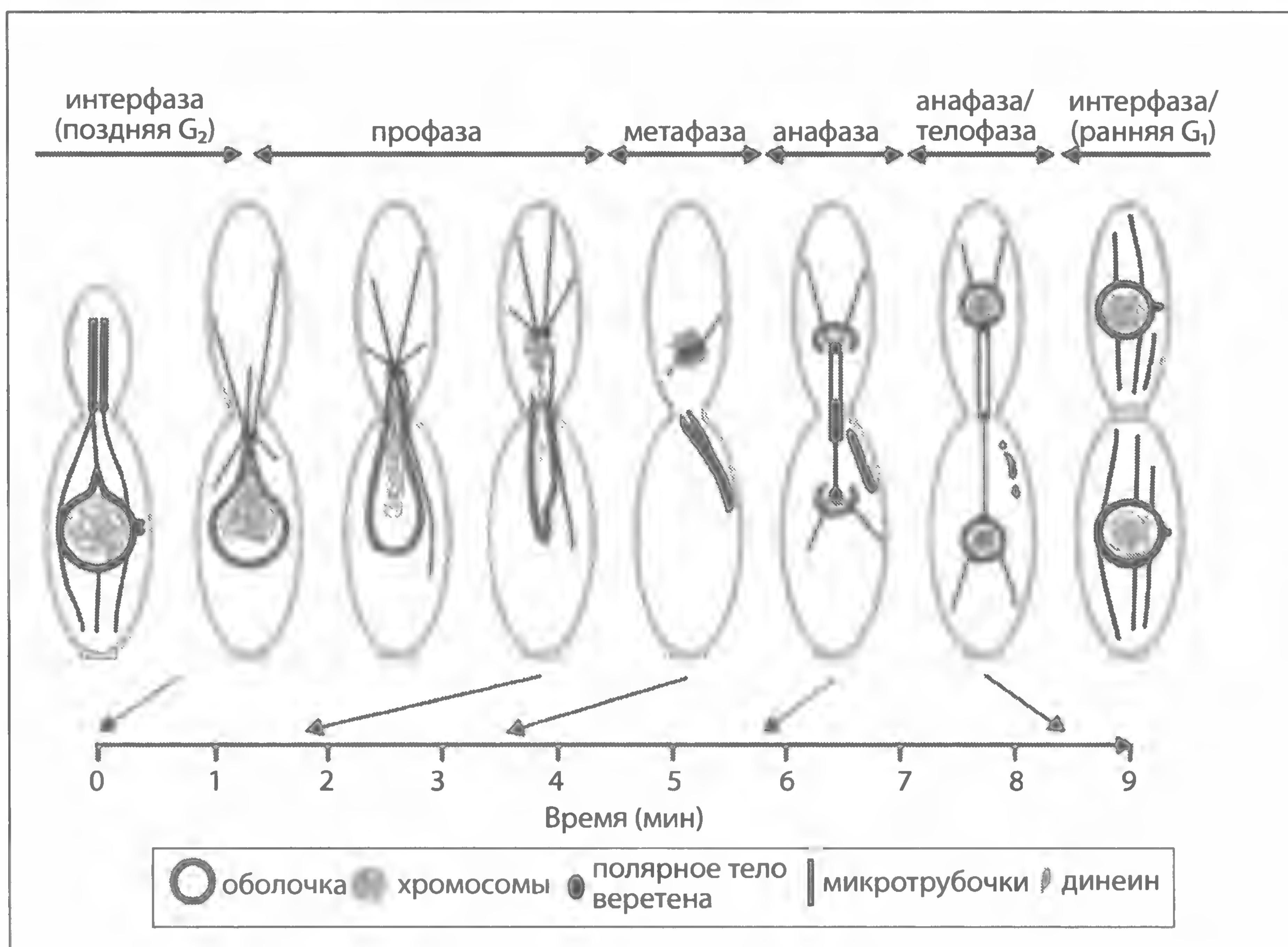


Рис. 101. Митоз у базидиомицета, вызывающего головню злаков *Ustilago maydis*. В профазе митоза микротрубочки одним концом связаны с полярным телом веретена, а другим — с кортексным динеином, локализованным в почке. Сокращение микротрубочек приводит к разрушению ядерной оболочки около ПТВ, связанному в свою очередь с хромосомами, и освобождению хромосом с ПТВ в цитоплазму. В анафазе сестринские хроматиды расходятся и вокруг них формируется новая ядерная оболочка (Straube et al., 2005).

вает микротрубочки, связанные с ПТВ, ядерная оболочка от натяжения локально разрушается, и из ядра вытягиваются хромосомы, связанные с веретеном деления. Метафаза протекает в дочерней клетке. В анафазе сестринские хроматиды разделяются, один набор остается в дочерней клетке, а другой за счет растяжения веретена деления попадает в материнскую клетку. В поздней анафазе начинается синтез новой ядерной оболочки вокруг дочерних хромосом. В телофазе этот процесс завершается. Старая ядерная оболочка лизируется и наступает цитокинез, в результате формируются две равноценные клетки (рис. 101).

Важно отметить, что из-за многоядерности грибных гиф, цитокинез у многих представителей неполный (см. главу Септы и цитокинез) и происходит не в каждом клеточном цикле.

Грибы, вероятно, используют три разные стратегии для координации митоза в многоядерных клетках.

Первый тип, наблюдаемый у *Ceratocystis fagacearum,* характеризуется синхронным делением ядер в клетке (встречается редко), второй тип встречается у таких грибов как *Aspergillus nidulans*, *Alternaria solani* и *Fusarium oxysporum* и характеризуется *парасинхронной* волной митоза, которая развивается по клетке гифы, при этом соседние ядра находятся в разных стадиях митоза. Третий тип характерен для грибов *Neurospora crassa* и *Ashbya*

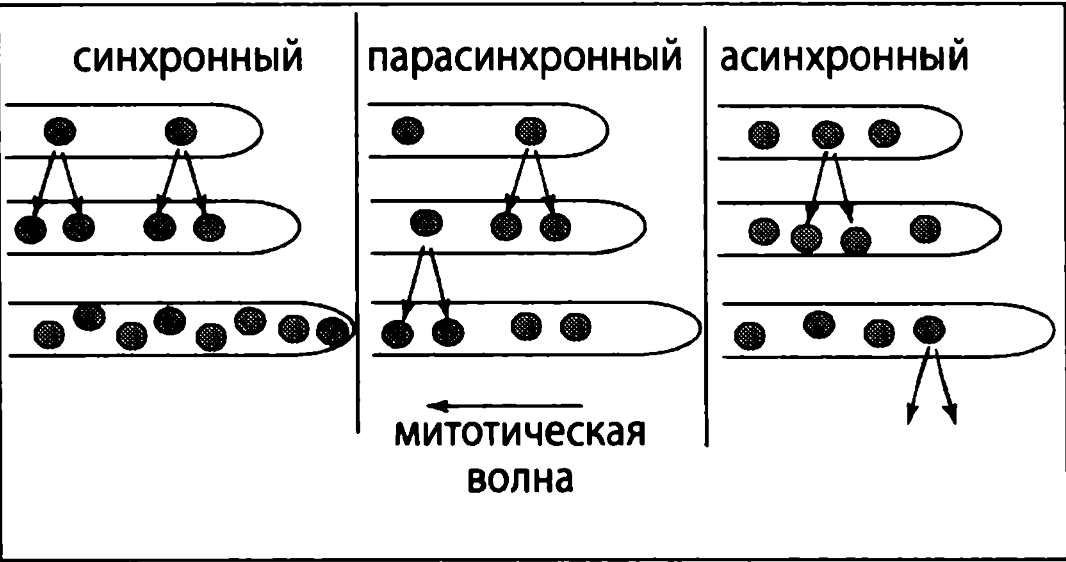


Рис. 102. Образцы ядерного деления у многоядерных грибов. В синхронных делениях все ядра делятся одновременно. В парасинхронном митозе происходит инициация в одной точке, а далее волна митозов распространяется вниз по гифе линейно, поэтому ядра делятся последовательно. В асинхронном делении ядра делятся независимо от соседних, давая случайное распределение митотических ядер в гифе (Gladfelter, 2006).

gossypii. В мицелии этих грибов наблюдается *асинхронный митоз*, при котором индивидуальные ядра вступают в митоз автономно. Механизмы, лежащие в основе поведения ядер, неизвестны (рис. 102).

9.6. Жизненные циклы грибов, ядерный цикл и место мейоза

Под жизненным циклом понимают совокупность всех фаз развития, пройдя которые организм достигает зрелости и способен дать начало следующему поколению. В ядерном жизненном цикле дополнительно учитывается ядерный статус. Признаки, определяющие ядерный статус грибов, указаны в табл. 6.

Таблица 6

Признаки, определяющие ядерный статус грибов (http://ru.wikipedia.org/wiki/)

Число ядер в клетке	одно – монокарион	два – дикарион	много – мультикарион
Состав ядер	генетически однородный – гомокарион		
		разнородный — гетерокарион	
Плоидность	1n – гаплоиды 2n – диплоиды >2n — полиплоиды		
Состав хромосом	гомозиготы гетерозиготы		

Ядерный статус определяется комбинацией признаков, представленных в данной таблице. Например, дикарион и мультикарион могут быть гомокарионом или гетерокарионом, ядра в моно-, ди- и мультикарионе — иметь различную плоидность, ди- и полиплоидные ядра могут быть гомозиготными или гетерозиготными.

Царство грибов характеризуется разнообразием жизненных циклов и вариантов ядерного статуса (плоидность, количество ядер в клетке, их генетическая разнородность или однородность).

У различных таксономических групп грибов Дж. Рэйпер выделил 7 типов жизненных циклов (рис. 103).

Бесполый цикл характерен для нескольких десятков тысяч видов аскомицетов и базидиомицетов, утративших половую стадию — так называемых дейтеромицетов (1). Мейоз у этой группы отсутствует и плоидность неизвестна, рекомбинации происходят в парасексуальном цикле.

Гаплоидный цикл известен у зигомицетов, многих хитридиомицетов (2). Мицелий содержит множество гаплоидных ядер (мультикариотический мицелий), которые делятся митотичес-

ки по мере роста гиф. Диплоидная стадия представлена только зиготой (зигоспорой), которая после периода покоя редукционно делится (*зиготный мейоз*) и даёт начало новому гаплоидному поколению.

Гаплоидный цикл с ограниченным дикарионом характерен для большинства аскомицетов, мицелий их также чаще всего бывает гаплоидный мультикариотический (3). Гаметы или гаметангии вначале сливаются цитоплазмами (происходит *плазмогамия*) без слияния ядер (*кариогамии*) и прорастают дикариотическими гифами, называемыми также *аскогенными*. На концах аскогенных гиф формируются сумки, в которых происходит кариогамия, затем без периода покоя диплоидное ядро делится мейозом (*зиготный мейоз*) и даёт гаплоидные аскоспоры. Скрытая изменчивость у этих грибов отсутствует, так как все рецессивные мутации сразу проявляются в фенотипе.

Гаплоидно-дикариотический (гапло-дикариотический) цикл встречается у многих базидиомицетов — гименомицетов, гастеромицетов, ржавчинных грибов (4). Он сходен с предыдущим, но характеризуется длительной стадией дикариона, которая чаще всего бывает доминирующей. Стадия первичного гаплоидного мицелия также может быть длительной. *Мейоз зиготный.*

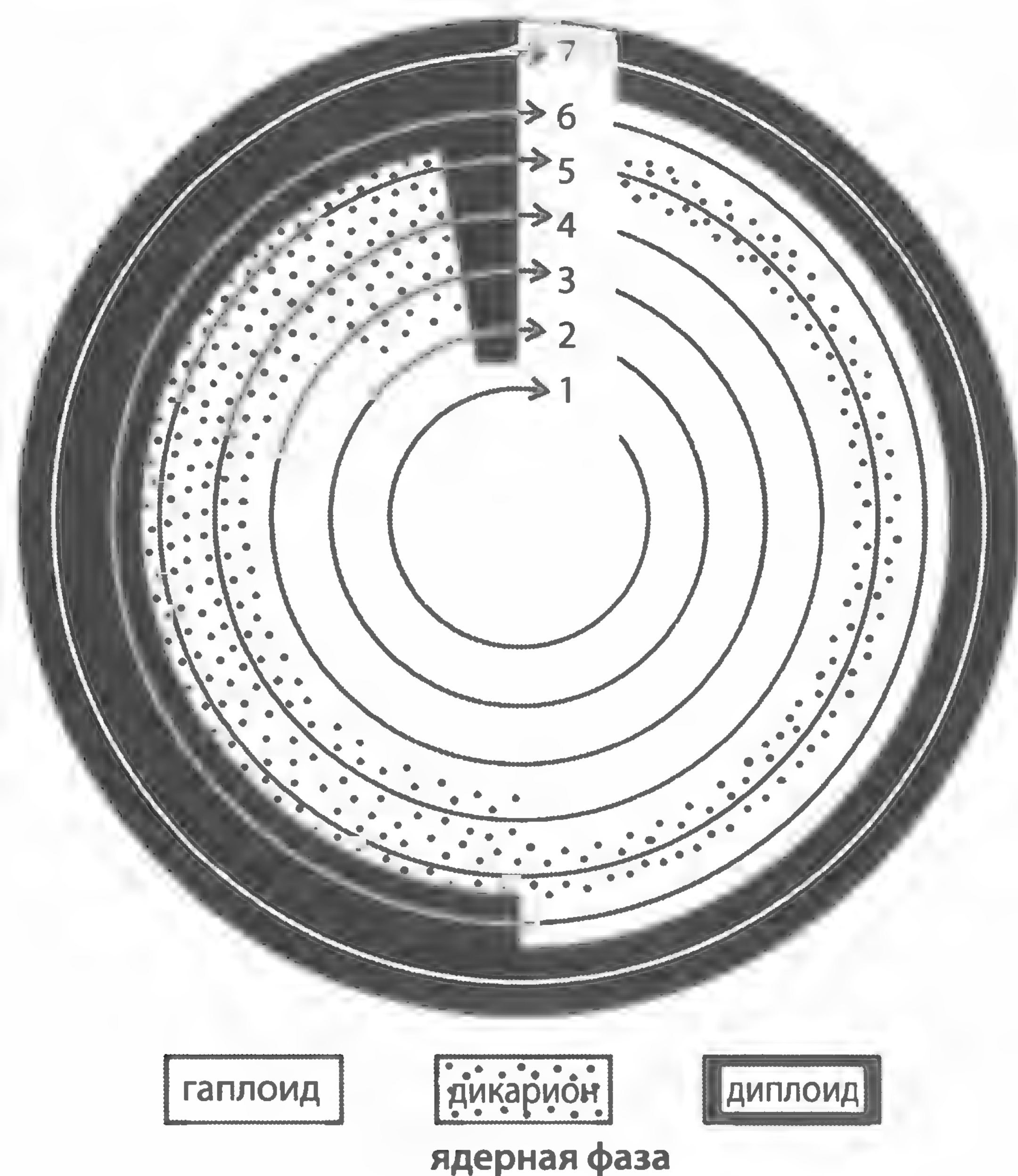


Рис. 103. Семь типов жизненных циклов у грибов (Raper, 1954). Подробности см в тексте.

Дикариотический цикл характерен для ограниченной группы базидиомицетов — головнёвых грибов (5). Гаплоидная фаза у них представлена базидиоспорами и прорастающими из них одноядерными *споридиями*, которые способны расти на питательной среде. Сливаясь попарно, споридии формируют дикариотический мицелий. Слияние дикарионов и мейоз происходят в головневых спорах при прорастании базидий с базидиоспорами. *Мейоз зиготный.*

Гаплоидно-диплоидный (гапло-диплоидный) цикл встречается у низших водных грибов — бластокладиевых, хитридиомицетов (6). Диплоидный спорофит образует зооспоры, прорастающие в такие же диплоидные спорофиты (бесполое размножение) и мейоспорангии (*мейоз спорический или промежуточный*), дающие начало гаплоидному половому поколению — гаметофитам. Такой тип жизненного цикла характерен для многих водорослей, а у грибов встречается редко.

Диплоидный цикл известен у дрожжей *S. cerevisiae* и других сахаромицетов, кроме настоящих грибов, характерен также для оомицетов, например, *Phytophthora infestans* (7). Преобладает диплоидная стадия у почкующихся клеток, ядра которых в определённых условиях (например, истощение питательной среды) делятся мейозом (*мейоз гаметный*) и формируют гаплоидные аскоспоры. Клетки гаплоидного поколения также способны почковаться, но чаще диплоидизируются слиянием (спариванием), то есть выполняют функцию гамет.

Рассмотрим детали событий мейоза у грибов.

9.7. Мейоз

У грибов с половым процессом происходит **мейоз — деление диплоидного ядра и образование гаплоидных ядер**. У грибов диплоидные клетки, в которых наступает мейоз, это зигоспорангий, материнская клетка сумки или базидии (у Zygomycota. Ascomycota и Basidiomycota соответственно). В ходе мейоза **происходит рекомбинация сегментов гомологичных хромосом**.

В мейозе происходит один раунд репликации ДНК и два последовательных деления. Первое деление редукционное (**мейоз I**), когда происходит расхождение гомологичных хромосом (таким образом, происходит сокращение в плоидности ядер от диплоидного к гаплоидному). Второе — мейотическое деление, эквационное, так как не происходит редукции числа хромосом; в нем расходятся сестринские хроматиды и оно сравнимо с митозом (**мейоз II**). В отличие от большинства растений и животных, грибы претерпевают мейоз с интактной ядерной мембраной.

9.7.1. Кариогамия-Профаза I. Образование пар и синапсис

В процессе кариогамии происходит слияние нуклеоплазмы и ядрышек. Репликация ДНК происходит до кариогамии (*Coprinopsis cinerea*, *N. crassa*, *Sordaria fimicola*).

После кариогамии диплоидное ядро вступает в самую длительную стадию мейоза профазу I. Она в свою очередь состоит из пяти стадий (рис. 104). Первая стадия лептотена (1) или стадия «тонких нитей» (хроматин максимально деконденсирован). На этой стадии электронная микроскопия выявляет хромосомные оси (осевые элементы), которые состоят из белков когезинов и белков, участвующих в формировании латеральных элементов белкового синаптонемного комплекса (СК). По обе стороны от осевого элемента хромосомы

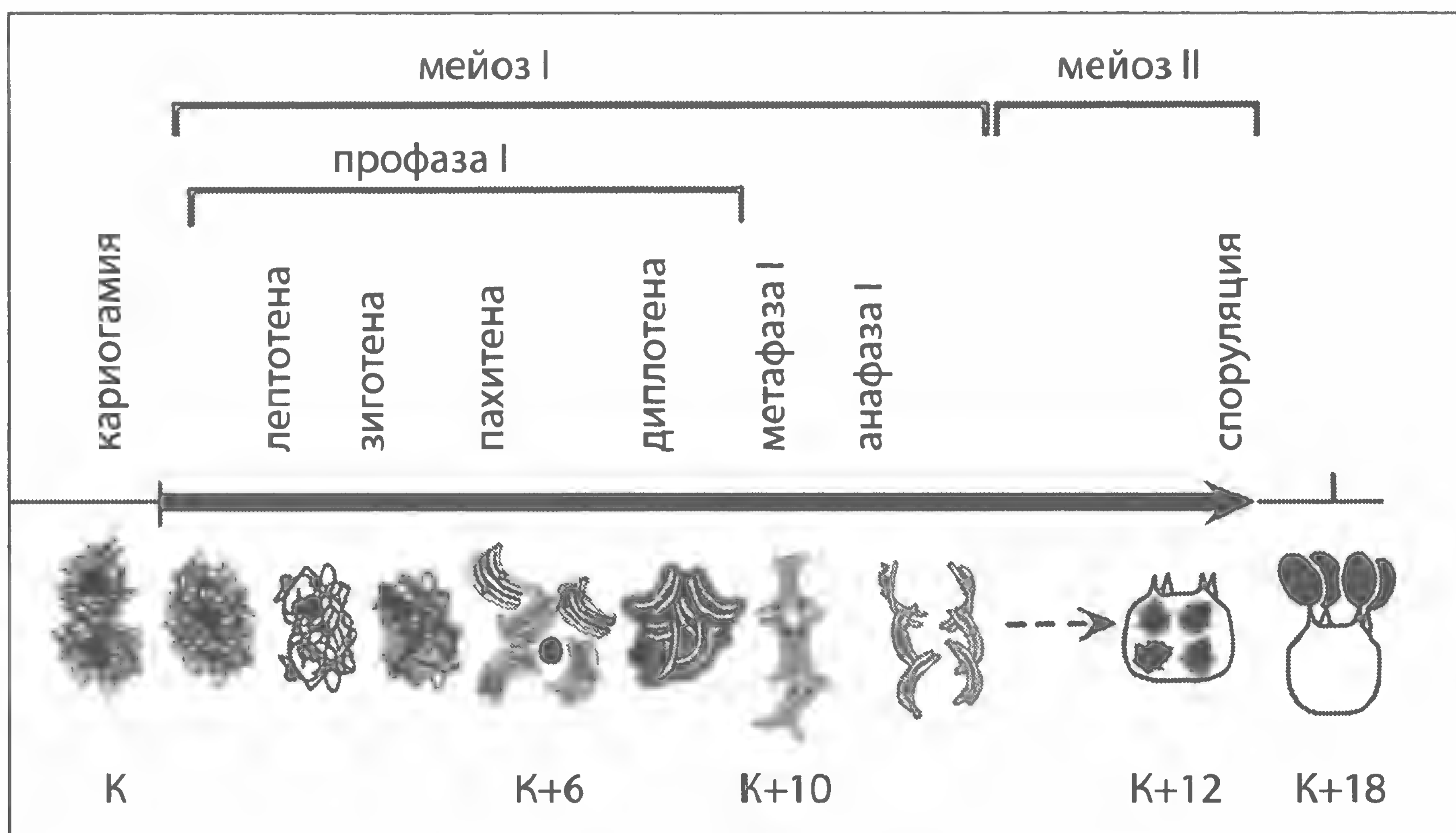


Рис. 104. Кариогамия и мейоз у *Coprinopsis cinerea* (схема). Мейоз у *C. cinerea* синхронный и начинается непосредственно после кариогамии (К). Формирование пар гомологичных хромосом и синапсис происходит в профазе первого деления мейоза в течение 6 ч после кариогамии. Еще через 2–4 ч гомологичные хромосомы разделяются в первом мейотическом делении. Через 12 ч после кариогамии происходит второе мейотическое деление, в результате образуются четыре мейотических продукта Через 6 ч после этого ядра мигрируют в базидиоспоры (Celerin et al., 2000).

на стадии лептотены располагаются сестринские хроматиды — элементарные фибриллы хроматина. В ранней лептотене под действием специфических для мейоза эндонуклеаз возникают множественные двунитевые разрывы молекул ДНК, которые являются первым шагом к многоступенчатому процессу генетической рекомбинации (см. далее).

В лептотене гомологичные хромосомы сближены на расстояние 300–400 нм в паре и образуют характерную для ранней профазы мейоза I конфигурацию «букет». Для этой стадии характерна кластеризация теломерных участков пар хромосом на внутренней поверхности ядерной мембраны. Формирование структуры «букета» играет важную роль в опознании и выравнивании гомологов, способствуя инициации синапсиса и рекомбинации хромосом. Поэтому формирование СК начинается на периферии ядра.

У большинства организмов в зиготене (2) между парами гомологов формируется белковая структура, синаптонемный комплекс. Осевые элементы гомологичных хромосом, соединившись попарно, превращаются в два латеральных элемента СК (рис. 105), в состав которых включаются специфические белки латеральных элементов (у дрожжей — Hop1 и Red1). У изученных грибов в пространстве между латеральными элементами под электронным микроскопом виден продольный центральный элемент. Он параллелен латеральным элементам и вся структура СК выглядит трехполосной (рис. 105). Центральный элемент СК связан поперечными волокнами, перпендикулярными оси гомологов, с боковыми элементами СК.

Третья стадия профазы I пахитена (3) или стадия «толстых нитей» по определению является стадией полного синапсиса. Полный синапсис встречается у большинства грибов, но есть и исключения, в том числе *Agaricus bisporus*, *A. nidulans*, *S. pombe* и *U. maydis*. Во время стадии пахитены происходят заключительные события рекомбинации и формирование рекомбинантных узелков (рис. 105).

***Формирование кроссинговера и генная конверсия* (рис. 106)**

Гомологичная рекомбинация (модель Холлидея, 1964) начинается с формирования двунитевых разрывов ДНК в лептотене, внедрения одноцепочечных 3'-концов в гомологичный участок несестринской хроматиды с помощью RecA-подобных белков и формирования «полухиазмы Холлидея» (рис. 106а). В зиготене и пахитене происходит репарация этих разрывов и разделение на гомологи (рис. 106б). В результате образуются два типа продуктов: некроссоверные, то есть по конфигурации концевых маркеров А и С не отличающиеся от исходных (рис. 106б и в, расположены слева) и кроссоверные, отличающиеся по маркерам А и С от исходных (рис. 106б и в, расположены справа). В рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, что может привести к появлению неспаренных оснований и наруше-

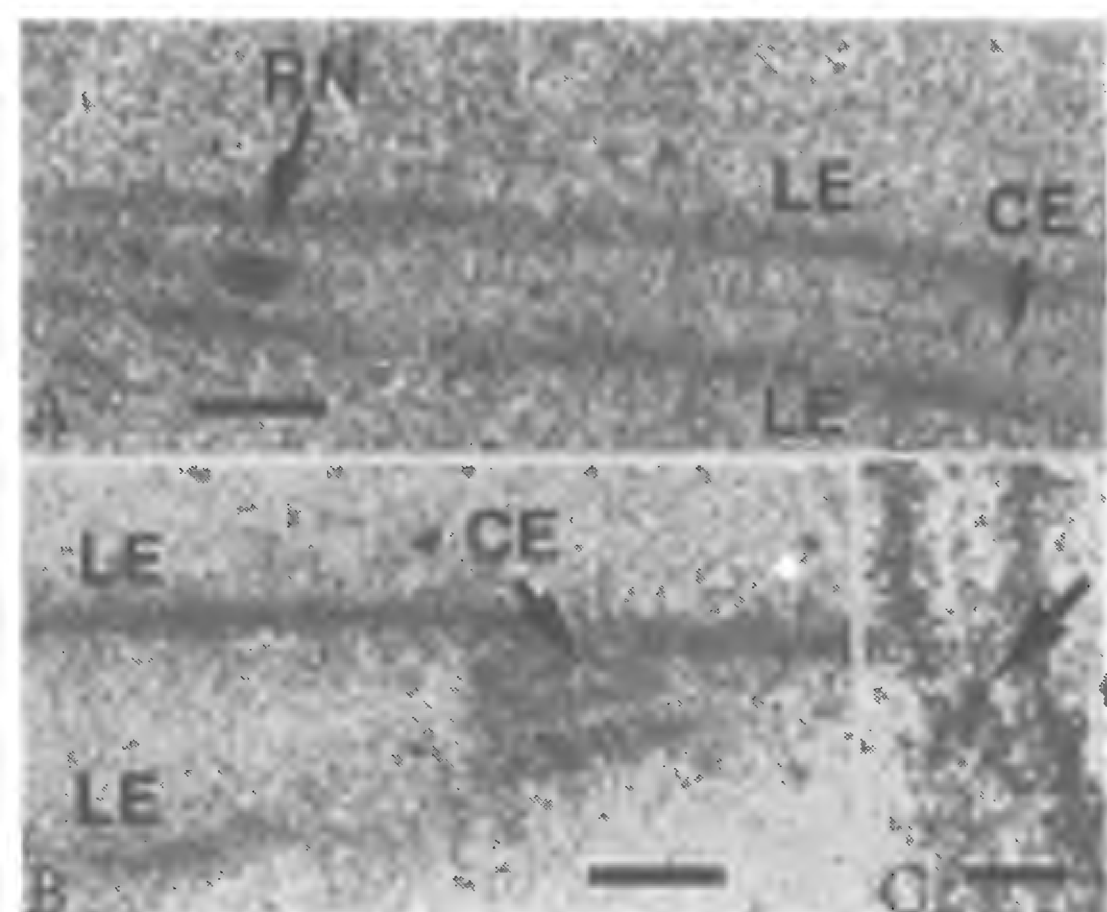


Рис. 105. Синаптонемный комплекс и рекомбинационные узелки *Sordaria macrospora*.
А. Пахитена, синаптонемный комплекс (СК); LE -латеральные элементы и СЕ — центральный элемент комплекса. Стрелка указывает на поздний рекомбинацинный узелок (RN), расположенный на СЕ. В. В зиготене центральный элемент (СЕ) возникает между латеральными элементами (LE). С. Стрелка указывает на ранний рекомбинационный узелок, который представляет собой компартмент ферментов рекомбинации. Заметно различие в размере и плотности по сравнению с поздним рекомбинационным узелком на рис. А. Масштабный отрезок 100 нм (Zickler, 2006).

нию структуры двойной спирали ДНК. Нарушения исправляют ферменты эксцизионной репарации. Они проводят коррекцию неспаренных оснований в двухцепочечной молекуле ДНК, удаление неспаренного основания в одной цепи ДНК и застраивание образующейся бреши в другой по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым превращая (конвертируя) один аллель в другой (*генная конверсия*).

Когезия и разделение гомологов

Формирование единственного кроссовера еще не является достаточным, чтобы держать гомологи вместе до первого мейотического деления; требуется также слипание сестринских хроматид. Слипание обеспечивается когезиновым комплексом, который состоит из четырех белковых субъединиц, содержит мейозоспецифичный когезиновый белок Rec 8 и образует кольцевую структуру. В одной популярной модели кольцевая структура "охватывает" две сестринские хроматиды.

После стадии пахитены ядро входит в четвертую и почти сразу в пятую стадии профазы I диплотену и диакинез (рис. 104). На стадии диплотены и диакинеза СК поэтапно разрушается, исчезает контакт гомологичных хромосом во всех локусах, кроме тех локусов, где произошел кроссинговер и сформировались *хиазмы* или рекомбинантные узелки (физи-

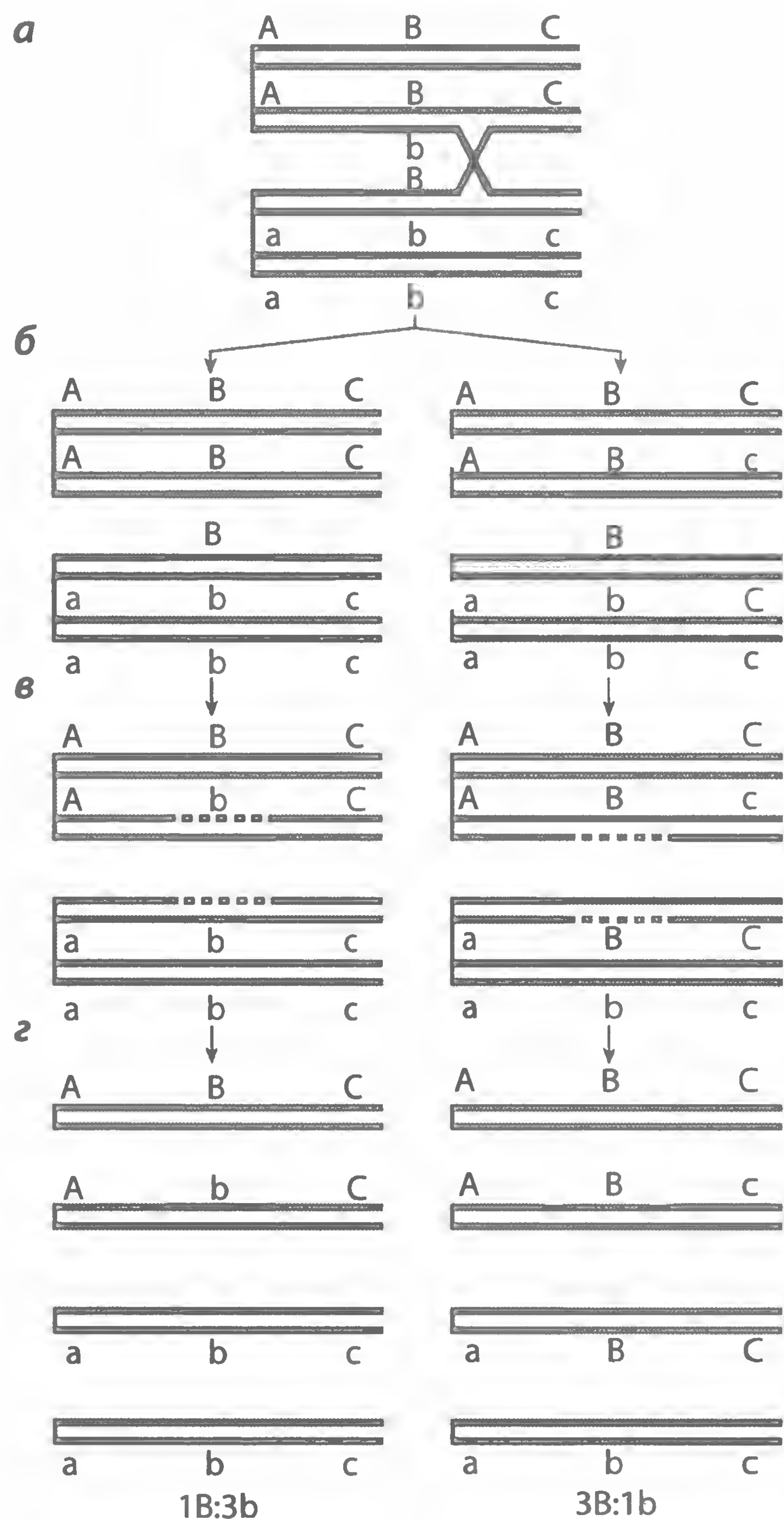


Рис. 106. Упрощенная схема кроссинговера и конверсии гена по модели Холлидея.

Линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии — хроматиде. Линии светло-серого и темно-серого оттенка — разные гомологи. АВС и авс — маркерные гены, представленные доминантными и рецессивными аллелями соответственно. Вертикальные линии слева обозначают центромеры, связывающие сестринские хроматиды.

Пара светло-серых и пара темно-серых хроматид образует тетраду.

а — полухиазма Холлидея, сформированная в результате обмена цепями между двумя хроматидами;

б — два типа продуктов рекомбинации, возникшие в результате двух способов разрешения полухиазмы. Слева структуры с гетеродуплексом, но без кроссинговера по внешним маркерам; справа структуры с гетеродуплексом и кроссинговером по внешним маркерам;

в — в левой тетраде происходит конверсия от В к b, в правой тетраде от b к В. Направление конверсии в тетрадах выбрано произвольно; произвольно выбрана и стадия, на которой происходит конверсия;

г — продукты рекомбинации (Глазер, 2000).

ческие перекресты несестринских хроматид). На этой стадии происходит удвоение ПТВ и формирование веретена деления.

Профаза I самая продолжительная. Так, у базидиомицета *Coprinopsis cinerea* она занимает 13 ч, а все остальные стадии мейоза занимают 2 ч.

9.7.2. Метафаза-анафаза I

В метафазе I происходит прикрепление микротрубочек веретена деления к кинетохорам хромосом. У базидиомицета *C. cinerea* в позднюю метафазу ядерная оболочка не выявляется, а у *S. cerevisiae* она сохраняется интактной на протяжении всех стадий мейоза.

В анафазе I, в отличие от митоза, в первом делении мейоза к разным полюсам несинхронно расходятся гомологичные пары хромосом, связанные хиазмами, а не сестринские хроматиды. Сестринские хроматиды остаются связанными когезинами в области центромер вплоть до второго деления мейоза. Как уже было сказано выше, в состав комплекса когезинов у дрожжей входит специфичный для мейоза когезин Rec8; от действия сепаразы, лизирующей когезины (склеивают сестринские хроматиды), его защищает белок Sgo1.

В телофазе I группа гомологичных хромосом останавливается около ПТВ, восстанавливается (*C. cinerea*) ядерная оболочка. Ядро в позднюю телофазу по структуре соответствует ядру перед слиянием.

9.7.3. Мейоз II

Далее наступает короткая интерфаза без репликации ДНК. Вскоре хроматин становится менее конденсированным и наступает эквационное деление мейоза II: профаза II, метафаза II, анафаза II, телофаза II. Во втором делении центромерный когезин теряется, и сестринские центромеры разделяются.

Два деления мейоза приводят к образованию четырех гаплоидных ядер. У *S. cerevisiae* в сумке образуются четыре аскоспоры. Сразу после мейоза может наступить постмейотический митоз либо до (как у *N. crassa*), либо после (как у *C. cinerea*) образования спор. В результате у *N. crassa* формируются восемь одноядерных аскоспор в сумке, а у *C. cinerea* четыре двуядерные базидиоспоры на базидии.

Литература

Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. 2007. Синаптонемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Т-во научных изданий КМК. 358 с.

Глазер В.М. 2000. Конверсия гена // Соросовский Образовательный Журнал. Т.6. No.1. С.23–31.

Глазер В.М. 1998. Гомологичная генетическая рекомбинация // Соросовский Образовательный Журнал. No.7. С.13–21.

Торгашева А.А. 2013. Мейоз: что нужно пережить ради уменьшения числа хромосом вдвое // Вавиловский журнал генетики и селекции. Т.17. С.17–28.

Adam S.A. 2001.The nuclear pore complex. Review // Genome Biology. Vol.2. No.9. P.0007.1–0007.6

Aist J.R. 1969. The mitotic apparatus on fungi *Ceratocystis fagacearum* and *Fusarium oxysporum* // The Journal of cell biology. Vol.40. P.120–135.

Aist J.R., Bayles C.J. 1991. Ultrastructural basis of mitosis in the fungus *Nectria baematococca* (sexual stage of *Fusarium solani*) // Protoplasma. Vol.161. No.2-3. P.111–122.

Aist J.R., Morris N.R. 1999. Mitosis in filamentous fungi: How we got where we are. Review // Fungal Genetics and Biology. Vol.27. P.1–25.

Aist J.R., Willams P.H. 1972. Ultrastructure and time course of mitosis in the fungus *Fusariun oxysporum* // The Journal of cell biology. Vol.55. H.368–389.

Alberti-Segui C., Dietrich F., Altmann-Jöhl R., Hoepfner D., Philippsen P. 2001. Cytoplasmic dynein is required to oppose the force that moves nuclei towards the hyphal tip in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii* // Journal of Cell Science. Vol.114. No.5. P.975–986.

D'Angelo M.A., Hetzer M.W. 2008. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes // Trends Cell Biol. Vol.18. P.456–466.

Bähler J. 2005. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast // Annu. Rev. Genet. Vol.39. P.69–94.

Bähler J., Wyler T., Loidl J., Kohli J. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis // J. Cell Biol. Vol.121. No.2. P.241–256.

Barry E.G. 1996. Fungal chromosomes // J.Genet. Vol.75. No.3. P.255–263.

Brosch G., Loidl P., Graessle S. 2008. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi // FEMS. Microbiol. Rev. Vol.32. No.3. P.409–439.

Burns C., Pukkila P.J., Zolan M.E. 2010. [Meiosis. 7.] // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington. DC: ASM Press. P.81–95.

Campos A.N., Costa M.D. 2010. Basidiosporogenesis, meiosis and post-meiotic mitosis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* // Fungal Genet Biol. Vol.47. No.5. P.477–83.

Celerin M., Merino S.T., Stone J.E., Menzie A.M., Zolan M.E. 2000. Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior // EMBO J. Vol.19. No.11. P.2739–50.

Celio G.J., Padamsee M., Dentinger B.T.M., Josephsen K.A., Jenkinson T.S., McLaughlin E., McLaughlin D. 2007. Septal pore apparatus and nuclear division of *Auriscalpium vulgare* // Mycologia. Vol.99. No.5. P.644–654.

Courtheoux T., Gay G., Reyes C., Goldstone S., Gachet Y., Tournier S. 2007. Dynein participates in chromosome segregation in fission yeast // Biol. Cell. Vol.99. No.11. P.627–637.

McCully E.K., Robinow C.F. 1971. Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe:* a comparative study with light electron microscopy // J. Cell Science. Vol.9. P.475–507.

Duan Z., Andronescu M., Schutz K., McIlwain S., Kim Y.J., Lee C., Shendure J., Fields S., Blau C.A., Noble W.S. 2010. A three-dimensional model of the yeast genome // Nature letters. Vol.465. P.363–367.

Eusebio-Cope A., Suzuki N., Sadeghi-Garmaroodi H., Taga M. 2009. Cytological and electrophoretic karyotyping of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. P.342–351.

Fischer R. 1999. Nuclear movement in filamentous fungi // FEMS Microbiology Reviews. Vol.23. P.39–68.

Fong C.S., Sato M., Toda T. 2010. Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to c-tubulin-dependent spindle formation // EMBO J. Vol.29. P.120–130.

Freitaga M., Hickeyb P.C., Rajud N.B., Selkera E.U., Read N.D. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa* // Fungal Genetics and Biology. Vol.41. P.897–910.

Gladfelter A.S. 2006. Nuclear anarchy: asynchronous mitosis in multinucleated fungal hyphae // Current Opinion in Microbiology. Vol.9. P.547–552.

Gladfelter A.S., Berman J. 2009.Dancing genomes: fungal nuclear positioning // Nature Reviews. Microbiology. Vol.7. P.875–886.

Gladfelter A.S., Hungerbuehler A.K., Philippsen P. 2006. Asynchronous nuclear division cycles in multinucleated cells // J. Cell Biol. Vol.172. No.3. P.347–362.

Harris S.D. 2006. [Mitosis in filamentous fungi. 3] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.37–51.

Hayashi A., Ogawa H., Kohno K., Gasser S.M., Hiraoka Y 1998. Meiotic behaviours of chromosomes and microtubules in budding yeast: relocalization of centromeres and telomeres during meiotic prophase // Genes to Cells. No.3. P.587–601.

Heyting C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function // Current Opinion in Cell Biology. Vol.8. P.389–396.

Heun P., Laroche T., Shimada K., Furrer P., Gasser S.M. 2001. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus // Science. Vol.294. No.5549. P.2181–2186.

Hiraoka Y., Dernburg A.F. 2009. The SUN Rises on meiotic chromosome dynamics // Developmental Cell. Vol.17. P.598–605.

Horio T. , Kimura N., Basaki A., Tanaka Y., Noguchi T., Akashi T., Tanaka K. 2002. Molecular and structural characterization of the spindle pole bodies in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* var. *Japonicus* // Yeast. Vol.19. P.1335–1350.

Inoue S, Turgeon B.G., Yoder O.C., Aist J.R. 1998. Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration // J. Cell Sci. Vol.111. P.1555–1566.

Iwasa M., Tanabe S., Kamada T. 1998. The two nuclei in the dikaryon of the Homobasidiomycete *Coprinus cinereus* change position after each conjugate division // Fungal Genetics and Biology. Vol.23. P.110–116.

Jaspersen S.L., Winey M. 2004. The budding yeast spindle body: structure, duplication and function // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Vol.20. P.1–28.

Jung M.K., May G.S., Oakley B.R. 1998. Mitosis in wild-type and b-tubulin mutant strains of *Aspergillus nidulans* // Fungal Genetics and Biology. Vol.24. P.146–160.

Kim K.P., Weiner B.M., Zhang L., Jordan A., Dekker J., Kleckner N. 2010. Sister cohesion and structural axis components mediate homolog bias of meiotic recombination // Cell. Vol.14. No.6. P.924–937.

Kiseleva E., Allen T.D., Rutherford S., Bucci M., Wente S.R., Goldberge M.W. 2004. Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments // J. Structural Biol. Vol.145. P. 72–288.

Koszul R., Kleckner N. 2009. Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? // Trends in Cell Biology. Vol.19. No.12. P.716–724.

Lang C., Grava S., van den Hoorn T., Trimble R., Philippsen P., Jaspersen S.L. 2010. Mobility, microtubule nucleation and structure of microtubule-organizing centers in multinucleated hyphae of *Ashbya gossypii* // Mol. Biol. Cell. Vol.21. No.1. P.18–28.

Leitch A.R. 2000. Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells // Microbiology and Molecular Biology. Reviews. Vol.64. No.1. P.138–152.

Lu B.C. 1967. Meiosis in *Coprinus lagopus*: A comparative study with light and electrone microscopy // J. Cell Sci. Vol.2. P.529–536.

Lu B.C. 1978. Meiosis in *Coprinus lagopus*: VIII. A time-course study of the fusion and division of the spindle pole body during meiosis // J. Cell Biol. Vol.76. P.761–766.

Mahmoud A.M., Taga M. 2012. Cytological karyotyping and characterization of a 410 kb minichromosome in *Nectria haematococca* MPI // Mycologia. Vol.104. No.4. P.845–856.

Morris N.R. 2000. Nuclear migration: from fungi to the mammalian brain. Mini-Review // J. Cell Biol. Vol.148. No.6. P.1097–1101.

Neiman A.M. 2005. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology and Molecular Biology. Reviews. Vol.69. No.4. P.565–584.

Perez-Martin J. 1999.Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol Rev. Vol.23. No.4. P.503–523.

Prunuske A.J., Ullman K.S. 2006. The nuclear envelope: form and reformation // Current Opinion in Cell Biology. Vol.18. P.1–9.

Radu M., Steinlauf R., Koltin Y. 1974. Meiosis in *Schizophyllum commune* // Archives of Microbiology. Vol.98. No.1. P.301–310.

Raju N.B. 1992. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora* // Mycol. Reseach. Vol.96. No.4. P.241–262.

Raper J.R. 1954. [Life cycles, sexuality and sexual mechanisms in the fungi] // D.H. Wenrich, I.F. Leeis, J.R. Raper (eds.). Sex in Microorganisms. Washington: .Amer. Assoc. Adv. Sci. P.42–81.

Roberts P., Moshitch-Moshkovitz S., Kvam E., O'Toole E., Winey M., Goldfarb D.S. 2003. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular Biology of the Cell. Vol.14. P.129–141.

Roeder G.S. 1995. Sex and the single cell: Meiosis in yeast. Review // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.92. P.10450–10456.
Roeder G.S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango // Genes & Dev. Vol.11. P.2600–2621.
Roper M., Ellison C., Taylor J.W., Glass N.L. Nuclear and genome dynamics. Review in Multinucleate Ascomycete Fungi. Review // Current Biology. Vol.21. No.18. P.786–793.
Shaw S.L., Maddox P., Skibbens R.V., Yeh E., Salmon E.D., Bloom K. 1998. Nuclear and spindle dynamics in budding yeast // Molecular Biology of the Cell. Vol.9. No.7. P.1627–1631.
Sherwood R.K., Bennett R.J. 2009. Fungal meiosis and parasexual reproduction—lessons from pathogenic yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.12. P.599–607.
De Souza C.P.C., Osmani S.A. 2007. Mitosis, not just open or closed // Eukaryotic Cell. Vol.6. No.9. P.1521–1527.
De Souza C.P.C., Osmani A.H., Hashmi S.B., Osmani S.A. 2004. Partial Nuclear Pore Complex Disassembly during Closed Mitosis in *Aspergillus nidulans* // Current Biology. Vol. 1. P.1973–1984.
Stadler D.R. 1996. Meiotic recombination in filamentous fungi // J. Genet. Vol.75. No.3. P.265–280.
Steinberg G. 2007. Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. Review // New Phytologist. Vol.174. P.721–733.
Storlazzi A., Gargano S., Ruprich-Robert G., Falque M., David M., Kleckner N., Zickler D. 2010. Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing // Cell. Vol.141.No.2. P.94–106.
Straube A., Brill M., Oakley B.R., Horio T. and Steinberg G. 2003. Microtubule organization requires cell cycledependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis* // Molecular Biology of the Cell. Vol.14. P.642–657.
Straube A., Weber I., Steinberg G. 2005. A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope // EMBO J. Vol.24 P.1674–1685.
Taddei A., Gasser S.M. 2012. Structure and function in the budding yeast nucleus // Genetics. Vol.192. P.107–129.
Taddei A., Schober H., Gasser S.M. 2010. The budding yeast nucleus // Gold Spring Harbor Perspectives in Biology. Vol.2. P.1–20.
Theisen U., Straube A., Steinberg G. 2008. Dynamic rearrangement of nucleoporins during fungal “open” mitosis // Molecular Biology of the Cell. Vol.19. P.1230–1240.
Torralba S., Pisabarro A.G., Ramirez L. 2004. Immunofluorescence microscopy of the microtubule cytoskeleton during conjugate division in the dikaryon *Pleurotus ostreatus* N001 // Mycologia. Vol.96. No.1. P.41–51.
Vogel S.K., Pavin N., Maghelli N., Jülicher F., Tolić-Nørrelykke I.M. 2009. Self-organization of dynein motors generates meiotic nuclear oscillations // PLoS Biology. Vol.7. No.4. P.0918–0928.
Wieloch W. 2006. Chromosome visualisation in filamentous fungi // Journal of Microbiological Methods. Vol.67. No.1. P.1–8.
Yamamoto A., Hiraoka Y. 2003. Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration // J. Cell Sci. Vol.116. No.22. P.4501–4512.
Yamamoto A., Tsutsumi C., Kojima H., Oiwa K., Hiraoka Y. 2001. Dynamic behavior of microtubules during dynein dependent nuclear migrations of meiotic prophase in fission yeast // Molecular Biology of the Cell. Vol.12. P.3933–3946.
Yu H-G., Koshland D.E. 2003. Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly and resolution of recombination-dependent chromosome linkages // J. Cell Biol. Vol.163. No.5. P.937–947.
Zickler D. 2006. [Meiosis in mycelial fungi 20] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.415–438.
Zheng L., Schwartz C., Magidson V., Khodjakov A., Oliferenko S. 2007. The spindle pole bodies facilitate nuclear envelope division during closed mitosis in fission yeast // PLoS Biology. Vol.5. P.1530–1542.

Глава 10.
Метаболизм у грибов[1]

10.1. Общие представления

Метаболизм — сумма всех химических изменений в клетке грибов, включающих в себя как деструктивные (катаболизм), так и конструктивные процессы (анаболизм).

Фундаментальная функция **метаболизма** — использование питательных веществ с образованием АТФ, восстановленных коферментов (НАДН, НАДФН) и предшественников клеточных компонентов. Для грибов характерен *хемоорганотрофный* метаболизм, характеризующийся использованием в качестве источника энергии различных органических соединений и приводящий к их полному окислению до CO_2 и H_2O.

В каждой клетке протекают сотни химических реакций, совокупность которых и представляет собой обмен веществ или метаболизм. Участвующие в обмене веществ химические соединения называются ***метаболитами***. Вне клетки почти все эти превращения протекали бы очень медленно и неупорядоченно. Упорядоченные последовательности химических реакций, происходящие с высокой продуктивностью в клетке, так называемые метаболические пути, возможны благодаря присутствию в клетке специфических ферментов.

У всех эукариот и грибов, в том числе, различают первичный и вторичный метаболизм.

Часть реакций, сходных для всех живых организмов (образование и расщепление нуклеиновых кислот, белков и пептидов, большинства углеводов и т.д.), получила название *первичного метаболизма*, или *первичного обмена*. Помимо реакций первичного обмена сущес-

---

[1] Сокращения

ААК — α-аминоадипиновая кислота
ГМФ — гексозо-монофосфатный путь
Г3Ф — глицеральдегид-3-фосфат
ДАГ — диацилглицерин
ДАГАТ — диацилглицерин-ацилтрансфераза
ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат
ДПК — диаминопимелиновая кислота
ЖК — жирные кислоты
ЖКС — синтаза жирных кислот
КП — путь ксилитола — метаболический путь расщепления пентоз
ЛТ — липидные тела или олеосомы
ЛФК — лизофосфатидная кислота
ПТ — плодовое тело
СЭ — стериловый эфир
ТАГ — триацилглицерины
ФК — фосфатидная кислота
ФКП — фосфокетолазный путь
ФЛ-ДАГАТ — фосфолипид: ДАГ-ацилтрансфераза
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот или цикл Кребса
ЭД — путь Энтнера-Дудорова
ЭМП — путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса
ЭР — эндоплазматический ретикулум
CoA — коэнзим А

твует значительное число метаболических путей, приводящих к образованию соединений, свойственных лишь определённым группам организмов и отражающим, в частности, индивидуальные особенности грибного таксона. Эти реакции объединяются термином *вторичный метаболизм*, а их продукты называются *продуктами вторичного метаболизма.* Метаболизм включает в себя биохимическую *ассимиляцию* (анаболические пути, включающие процессы восстановления и приводящие к образованию новых клеточных компонентов) и *диссимиляцию* (катаболические пути, обеспечивающие расщепление сложных молекул до более простых, включают окислительные процессы, которые вызывают удаление электронов из веществ или интермедиатов, используют НАД и НАДФ как кофакторы и приводят к генерации энергии).

В зависимости от конечного акцептора электронов в поставляющих энергию реакциях расщепления (катаболические реакции), различают два основных типа диссимиляции: в первом случае конечным акцептором электронов служит кислород (*аэробная диссимиляция* или *клеточное дыхание*), во втором случае — органическая молекула, которая самостоятельно возникает в результате расщепления (*анаэробная диссимиляция* или *брожение*). Грибы, которые не могут использовать кислород, облигатные анаэробы, встречаются редко и ограничены хитридиомицетами, обитающими в рубце травоядных животных, и внутриклеточными паразитами животных — микроспоридиевые грибы. Факультативными анаэробами, вырабатывающими энергию с помощью брожения в условиях недостатка кислорода, являются многие дрожжевые грибы.

На примере *Aspergillus niger* была проведена идентификация и реконструкция основных метаболических путей, включая геномную интеграцию, биохимическую и физиологическую информацию об этом грибе и родственных организмах. Удалось показать, что метаболизм углеводов включает 284 метаболита и 335 реакций, из которых 268 представляют биохимические превращения, а 67 — транспортные процессы между различными внутриклеточными компартментами, а также между клеткой и окружающей средой.

10.2. Метаболизм углеводов у грибов

Грибы сталкиваются с разнообразными углеродсодержащими субстратами, и способность утилизировать широкий круг таких компонентов может определять их способность к выживанию. Не будет преувеличением сказать, что большинство грибов имеют дело с теми или иными формами растительных субстратов (живые растения, подстилка и опад, растительные остатки разной степени разложения). Основным источником углерода в растительных субстратах являются углеводы (моносахариды, олигосахариды и полисахариды) и их различные сложные производные (например лигно-целлюлозный комплекс). Простые сахара (моно-, ди- и трисахариды) значительно реже встречаются в природных растительных субстратах по сравнению с полимерными формами сахаров (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин и др.). Полисахариды перед тем, как проникнуть в клетки грибов, должны быть вначале гидролизованы до простых. С этой целью грибы синтезируют достаточно широкий спектр экзоферментов. Углеводы являются наиболее калорийными и легко усваиваемыми источниками углерода при культивировании грибов.

10.2.1. Метаболизм глюкозы у грибов

Основным и наиболее универсальным источником энергии для обеспечения метаболических процессов у грибов является глюкоза (рис. 107).

Транспортеры глюкозы у грибов классифицируются как транспортеры с высоким сродством к глюкозе, если Km находится в микромолярной концентрации (например, < 50 мкмоль для транс-

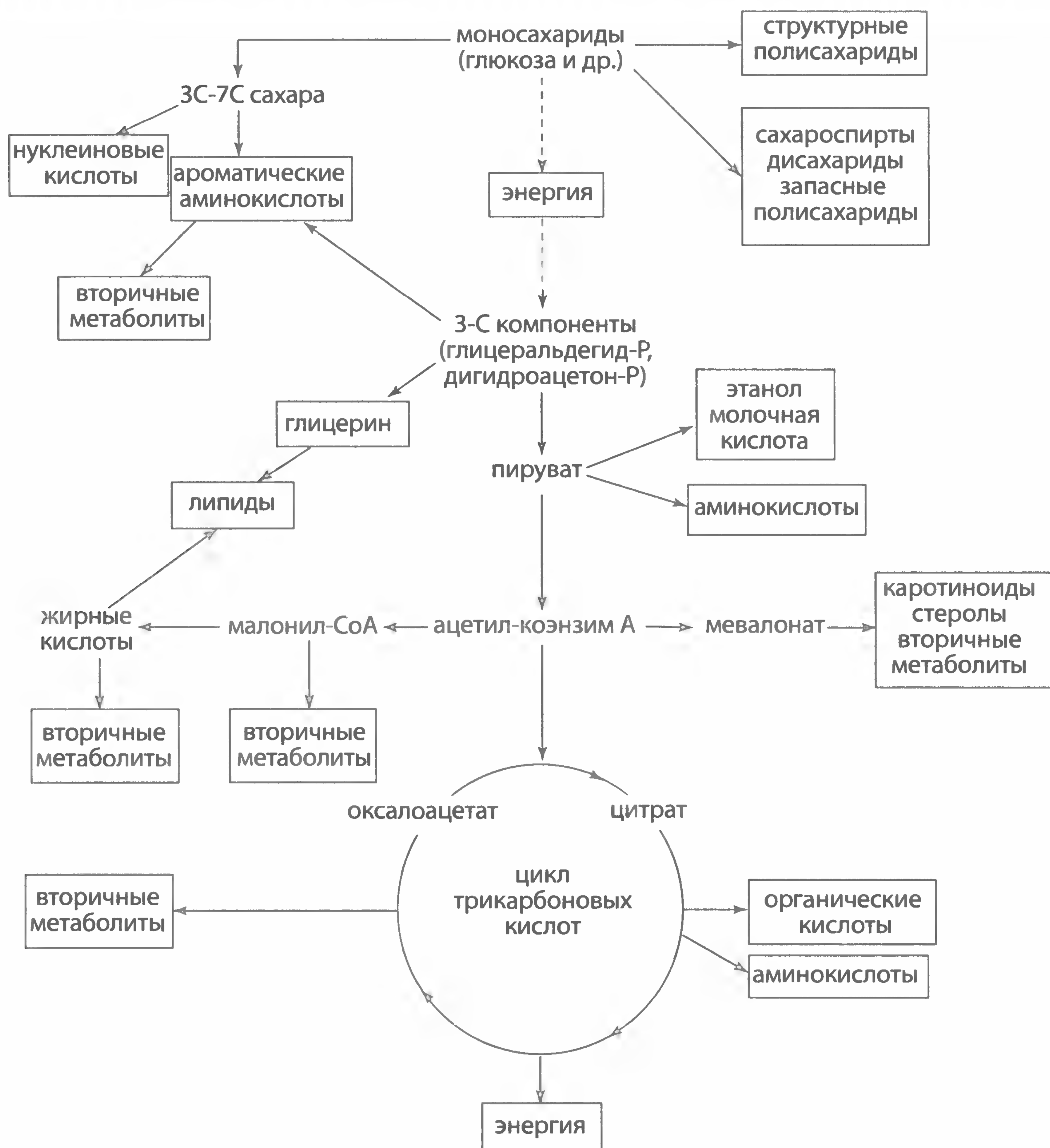


Рис. 107. Центральные метаболические пути у грибов. Показано как главные энерго-поставляющие пути (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и цикл трикарбоновых кислот) обеспечивают клетки грибов предшественниками для биосинтеза различных продуктов метаболизма (в рамках) (Deacon, 2005).

портеров с высоким сродством у мицелиальных грибов) и транспортеры с низким сродством, если Km для глюкозы находится в миллимолярном диапозоне концентраций. Транспортеры с высоким сродством к глюкозе обычно экспрессируются в процессе углеродного голодания и репрессируются высокими концентрациями глюкозы. Транспортеры с низким сродством к глюкозе обычно экспрессируются при высокой концентрации глюкозы или другой гексозы. Идентификация и характеристика генов, кодирующих транспортеры *Saccharomyces cerevisiae*, показали, что в каждую транспортную систему вносят вклад множество транспортеров. Все транспортеры глюкозы у грибов, охарактеризованные к настоящему времени, принадлежат к классу «Транспортеров сахаров» суперсемейства посредников (http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF0OO83).

Клетки *S. cerevisiae* имеют множество белков, которые могут транспортировать глюкозу через мембрану дрожжей; 17 из них (с Hxtl по Hxtllp, с Hxtl3 по Hxtl7p и Gal2p) принадлежат к семейству транспортеров глюкозы дрожжей. Эти транспортеры отличаются специфичностью к глюкозе, фруктозе, маннозе и галактозе. Геном мицелиальных грибов содержит множество генов, сходных с генами транспортеров гексоз. *A. nidulans* содержит 109, а *N. crassa* 45 генов, которые предположительно кодируют белки, принадлежащие к клану транспортеров сахаров. В некоторых случаях эти белки могут быть переносчиками других молекул, отличных от сахаров.

10.2.1.1.Катаболизм глюкозы у грибов

Катаболизм глюкозы традиционно делят на три фазы: гликолиз (1), метаболизм пирувата и цикл трикарбоновых кислот (2), окислительное фосфорилирование (3). Ферменты, участвующие в этих процессах у грибов, в целом сходны с ферментами других эукариотических организмов.

10.2.1.1.1. Гликолиз

Гликолиз может быть определен как физиологическая конверсия глюкозы до пирувата. У грибов описано три пути гликолиза: путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП), гексозомонофосфатный (ГМФ) или пентозофосфатный путь (ПФ) и путь Энтнера-Дудорова (ЭД) (рис. 108). Относительная важность этих путей варьирует у разных видов грибов. Пути ЭМП и ГМФ широко распространены, почти универсальны для грибов.

Путь ЭМП — главный путь гликолиза у большинства видов грибов, ГМФ — альтернативный минорный путь. Путь ЭД описан всего у нескольких видов грибов и у них он доминирует (*Tilletia caries* и *Caldariomyces fumago*).

Так как биохимические характеристики путей различны, не удивительно, что их относительная активность находится под влиянием условий роста гриба. У *Ustilago maydis* ГМФ путь отсутствует у спор и появляется только через 12 ч после их прорастания. В процессе роста и конидиообразования у *Aspergillus niger* оба пути (ЭМП, ГМФ) присутствуют все время. Причем активность ЭМП пути более высокая в процессе вегетативного роста, а активность ГМФ пути выше в процессе конидиообразования. Повышение активности ГМФ пути в процессе спорообразования на среде с NH_4 связано с высоким потреблением НАДФН для биосинтеза глутамата из α-кетоглутаровой кислоты. При использовании глутамата вместо NH_4 не происходит стимуляции пути ГМФ при спорообразовании. Была показана также стимуляция ГМФ пути у *Neurospora crassa* и *A. niger* при восстановлении нитрата. В целом более высокая активность ГМФ пути характерна для активно растущих клеток с высокими потребностями в НАДФН по сравнению с покоящимися клетками. Кроме того, помимо образования НАДФН важно то, что в ГМФ пути запасаются углеродные скелеты для биосинтетических реакций. Рибозофосфат требуется для синтеза РНК, а эритрозофосфат — для биосинтеза ароматических соединений. Хотя неорганический фосфат ингибирует *in vitro* активность фермента ГМФ пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, уровень фосфата в среде не влияет на активность ГМФ пути *in vivo*. Отмечается стимуляция ГМФ пути при добавлении пентоз как главного источника углерода.

У грибов показано присутствие двух путей вовлечения в гликолиз пентоз: путь ксилитола (КП), который вливается в ГМФ путь, и фосфокетолазный путь (ФКП) (рис. 108). Путь ФКП широко распространен у дрожжей и обеспечивает более эффективное расщепление пентоз до С2 фрагментов в процессе дыхания и брожения.

Хотя пути ЭМП и ГМФ проходят от глицеральдегида-3-фосфата к пирувату, они имеют разные метаболические функции. Путь ЭМП использует НАД в качестве акцептора электронов. Полученный НАДН может быть реокислен либо анаэробным путем через ферментацию пирувата до этанола или молочной кислоты или аэробно при окислительном фосфорилировании. Принципиальные функции пути ЭМП — расщепление сахаров с образованием

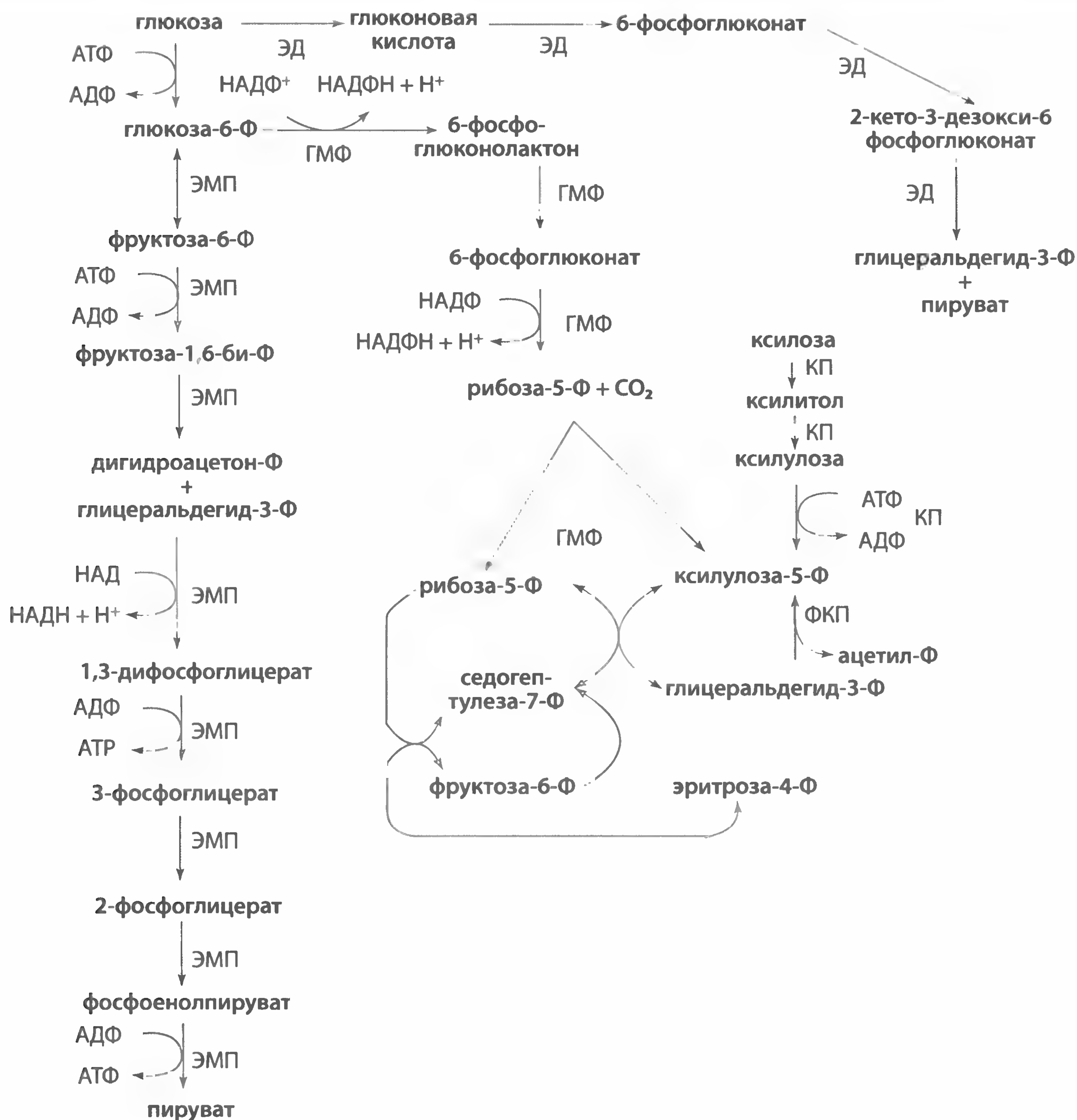


Рис. 108. Пути гликолиза у грибов. Реакции Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП), путь Энтнера-Дудорова (ЭД), гексозо-монофосфатный путь (ГМФ). Гликолиз пентоз представлен путем ксилитола (КП) и фосфокетолазным путем (ФКП) (Blumenthal, 1965; Griffin, 1996). Пояснения в тексте.

АТФ и пирувата, который расходуется для образования ацетил-коэнзима А (ацетил-СоА). Ацетил-СоА является центральным метаболитом в цикле лимонной кислоты (цикл Кребса) и в нескольких главных биосинтетических путях первичного и вторичного метаболизма, включающих синтез жирных кислот, изопреноидов и поликетидов. Путь ГМФ также выполняет все эти функции благодаря своей связи через глицеральдегид-3-фосфат с путем ЭМП. Но путь ГМФ приводит к восстановлению НАДФ до НАДФН. НАДФН — основной восстанавительный источник в биосинтезе, например, жирных кислот и сахароспиртов. НАДФН может быть также реокислен в митохондриях. Рибоза, синтезируемая в этом пути, используется для биосинтеза нуклеотидов и разных нуклеотидных коэнзимов (НАД, НАДФ, ФАД, ФМН). Имеются и другие источники восстановленного НАДФ для биосинтетических целей помимо ГМФ пути. Поэтому грибы не всецело зависят от этого пути. Более того, рибоза может образовываться в реакциях транскетолазой и трансальдолазой с

использованием фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата из пути ЭМП. В то же время этот путь важен в периоды восстановительного биосинтеза, такие как споруляция, накопление сахароспиртов.

Активность ЭМП пути контролируется имеющимися в распоряжении НАД и АДФ. В аэробных условиях ЭМП путь доминирует и может быть разделен на два этапа. Первый этап подготовительный, когда глюкоза подготавливается к деградации через фосфорилирование и расщепляется с формированием трехуглеродного сахара глицеральдегид-3-фосфата (ГЗФ). Этот этап является также собирательным, так как через него ряд других гексоз может войти в гликолитический путь. Для этого галактоза фосфорилируется и конвертируется в глюкозо-6-фосфат, манноза фосфорилируется и превращается в фруктозо-6-фосфат, а фруктоза фосфорилируется и конвертируется в ГЗФ. И, наконец, этот этап затратный, т.к. на фосфорилирование интермедиатов на этом этапе тратится две молекулы АТФ. Реакция расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две взимопревращаемые трехуглеродные молекулы — ГЗФ и диоксиацетонфосфат завершает подготовительный этап гликолиза, на котором расходуется энергия АТФ. Поскольку из двух полученных трехуглеродных молекул в норме только ГЗФ используется в последующей реакции, весь диоксиацетонфосфат превращается в конечном счете в ГЗФ и обе молекулы ГЗФ вовлекаются во второй этап гликолиза в одни и те же реакции.

Второй этап пути ЭМП, общий для всех сахаров, включает конверсию ГЗФ в пируват с сопутствующим восстановлением НАД и освобождением энергии, которая запасается в молекулах АТФ. Поэтому суммарный результат двух этапов пути ЭМП следующий: из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы пирувата, две молекулы АТФ и две молекулы НАДН. При этом большая часть энергии, запасенной в исходной молекуле глюкозы (686 ккал), остается в образующихся двух молекулах пирувата (546 ккал).

Путь ЭД у грибов встречается редко, он выявлен у видов грибов, лишенных фосфогексокиназы, фермента фосфорилирующего гексозы. *Caldariomyces fumago* и прорастающие споры головни *Tilletia caries* оказались способными окислять нефосфорилированную глюкозу и фосфорилировать уже глюконат при участии глюконаткиназы (рис. 108). Конечные продукты цикла ЭД могут включаться в циклы ЭМП и ГМФ, а также в цикл трикарбоновых кислот.

В аэробных условиях нормальный уровень АТФ у дрожжей может поддерживаться при окислительном фосфорилировании из меньшего количества глюкозо-6-фосфата. Скорость гликолиза в данном случае ограничивается уровнем, обеспечивающим достаточный запас пирувата для цикла трикарбоновых кислот. Это снижение скорости потребления глюкозы при сопутствующем снижении скорости гликолиза в аэробных условиях, известное как эффект Пастера, можно объяснить на основе конкуренции за АДФ и/или неорганический фосфат между АТФ-генерирующими реакциями в гликолизе и окислительным фосфорилированием. Такой механизм контроля поддерживается обратимым ингибированием гликолиза АТФ и цитратом.

Общая эффективность утилизации углеводов выражается как отношение сухой биомассы грибов (в г, мг) в определенном объеме среды к количеству потребленного источника углерода (в г, мг) за определенное время, иногда выраженное в процентах, так называемый *экономический коэффициент*. Он зависит от вида гриба, от уровня углеводов в среде, уровня следовых металлов, особенно цинка и от рН.

10.2.1.1.2. Метаболизм пирувата. Цикл трикарбоновых кислот

Вторая ступень окисления глюкозы в аэробных клетках — окисление пирувата до CO_2 через **цикл Кребса или трикарбоновых кислот (ЦТК)** (рис. 109).

При нормальных условиях роста ацетат, который образуется путем окислительного декарбоксилирования пирувата, является главным субстратом цикла Кребса. Однако некоторые синтезируемые вне митохондрий вещества являются также интермедиатами цикла Кребса и могут быть метаболизированы через этот цикл. Это углеродные скелеты аминокислот, глутамата и аспартата, которые также метаболизируются в клетке грибов. Эффективное функ-

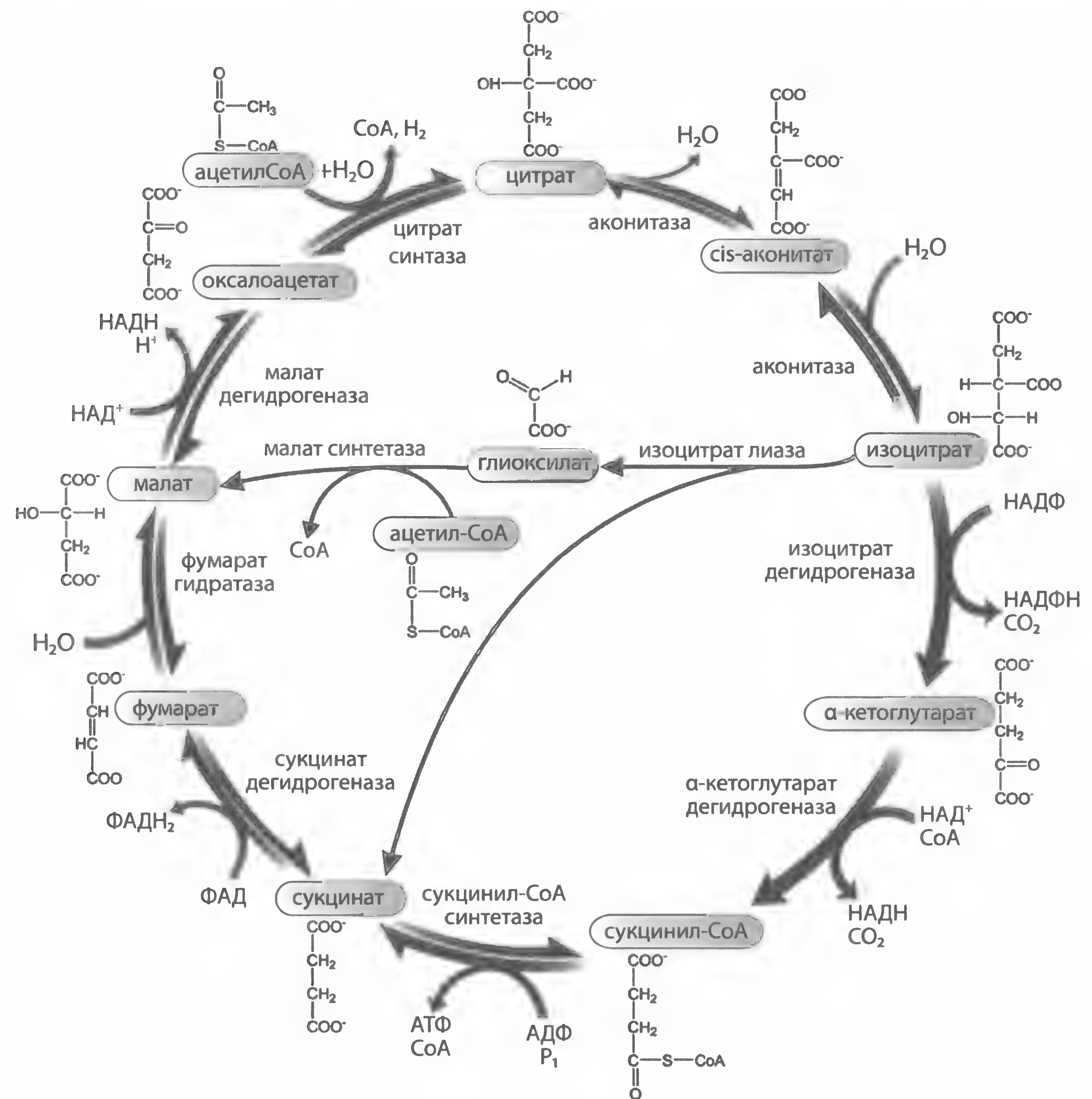


Рис. 109. Циклы трикарбоновых кислот и глиоксилатный. Пояснения см. в тексте. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glyoxylate_cycle.jpg

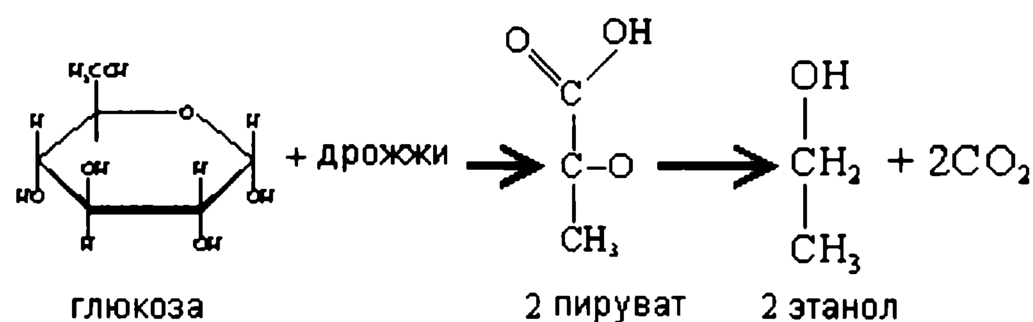
ционирование цикла Кребса определяется оксалоацетатом, субстратом для цитратсинтазы, и НАД как акцептора водорода. Активность цикла лимитируется нехваткой одного из них. ЦТК ведет к разложению ацетата на 2 молекулы $C0_2$ и 4 молекулы восстановителей, НАД(Ф) Н и ФАДН, которые могут затем окисляться в процессе окислительного фосфорилирования на заключительном этапе катаболизма глюкозы в дыхательной цепи с образованием АТФ. ЦТК не активен в анаэробных условиях.

Для нормального функционирования цикла Кребса необходимо поддержание определенного уровня участвующих в нем соединений. Однако некоторые из них могут использоват-

ся также другими метаболическими путями, вследствие чего их содержание снижается, а это может привести к остановке ЦТК. Так, оксалоацетат, кроме прямого участия в ЦТК, может быть использован в глюконеогенезе и в биосинтезе аминокислот. Восстановление его уровня в клетке может происходить двумя путями. Серия реакций, известных как **глиоксилатный цикл** (рис. 109), позволяет синтезировать две молекулы оксалоацетата из молекул изоцитрата и ацетата. При этом одна молекула оксалоацетата может поддерживать непрерывную работу ЦТК, а вторая использоваться для биосинтетических целей. Дополнительная молекула оксалоацетата может быть также синтезирована путем карбоксилирования пирувата в результате реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой. Исследования глиоксилатного цикла у аскомицетного гриба *Neurospora crassa* показали, что его функционирование зависит от разных условий. Так, в присутствии глюкозы в среде культивирования уровень интермедиатов цикла Кребса определяется реакцией карбоксилирования пирувата, глиоксилатный цикл при этом не функционирует. При росте же на ацетате, уровень интермедиатов целиком определяется активностью глиоксилатного цикла (рис. 109). У *Coprinopsis cinerea* ферменты глиоксилатного цикла обнаружены в глиоксисомах (разновидность пероксисом) и репрессируются глюкозой. Когда ацетат является единственным источником углерода, молекулы гексозы образуются из ацетата в процессе **глюконеогенеза** (т.е. синтеза глюкозы из неуглеводных предшественников, процесса прямо противоположного гликолизу). Этот процесс включает декарбоксилирование оксалоацетата до фосфоенолпирувата и поступление его в биосинтетический путь. Переключение с метаболизма глюкозы на метаболизм ацетата приводит к серьезным изменениям в активности глиоксилатного цикла и в роли цикла ЭМП. Было показано, что пируваткиназа, ключевой фермент гликолитического пути, имеет очень низкую активность в процессе глюконеогенеза и высокую активность в процессе гликолиза.

10.2.1.2. Катаболизм глюкозы у дрожжей в анаэробных условиях (спиртовое брожение)

Спиртовое брожение — химическая реакция брожения, осуществляемая дрожжами *S. cerevisiae*, в результате которой одна молекула глюкозы преобразуется в 2 молекулы этанола и в 2 молекулы углекислого газа. Реакция спиртового брожения подобна гликолизу. Расхождение начинается после образования пирувата. Конечный этап гликолиза заменяется двумя ферментативными реакциями. Сначала пируват подвергается декарбоксилированию, продуктом которого является ацетальдегид. Данная реакция происходит при участии пируватдекарбоксилазы. После чего ацетальдегид восстанавливается водородом, отщепляемым от кофермента НАДН, до этанола. Основная задача спиртового брожения — это окисление НАДН, чтобы он мог снова принять участие в гликолизе. Таким образом, продуктами спиртового брожения являются этанол и углекислый газ. Спиртовое брожение сопровождается запасанием энергии в виде двух молекул АТФ в расчете на одну молекулу глюкозы.



10.2.2. Глиоксилатный цикл

Глиоксилатный цикл — анаболический путь, был впервые описан как модифицированный цикл трикарбоновых кислот. Он обеспечивает превращение C2-единиц в C4-предшественники для биосинтетических целей, позволяя рост на жирных кислотах и C2-компонентах (рис. 109). Глиоксилатный цикл играет ключевую роль в превращении ацетил-CoA, образуемого при β-окислении жирных кислот, в сукцинат, который в дальнейшем может

превращаться в сахар при глюконеогенезе. Глиоксилатный цикл и ЦТК имеют общие реакции; превращение малата в оксалоацетат, оксалоацетата в цитрат и цитрата в изоцитрат в реакциях, катализируемых малатдегидрогеназой, цитратсинтазой и аконитазой соответственно (рис. 109). Однако вместо двух ступеней декарбоксилирования в ЦТК, изоцитрат и ацетил-СоА превращаются в сукцинат и малат в реакциях, катализируемых изоцитратлиазой и малатсинтазой. Изоцитратлиаза расщепляет С6-единицу в сукцинат и глиоксилат, последний конденсируется малатсинтазой с ацетил-СоА, образуя свободные СоА и малат. Полученные в результате глиоксилатного цикла и малат, и сукцинат могут быть преобразованы в оксалоацетат, одна молекула которого без ущерба для ЦТК может быть использована в биосинтетических целях.

Глиоксилатный цикл происходит или внутри или вне пероксисом и через мембрану пероксисом происходит транспорт интермедиатов. У бактерий глиоксилатный цикл протекает в цитоплазме, в то время как ранние исследования эукариот показали, что все ферменты глиоксилатного цикла локализованы в пероксисомах. Последние исследования на дрожжах выявили, что аконитаза локализована в митохондриях и цитоплазме. Предполагается, что аконитаза экспортируется из митохондрий в цитозоль, где и участвует в глиоксилатном цикле.

Имеются сведения, показавшие значимость глиоксилатного цикла для вирулентности патогенных грибов и бактерий. Охарактеризован мутантный штамм бактерии *Rhodococcus fascians*, у которого отсутствует малатсинтаза. Мутант был способен сохраняться на растительных тканях, но не способен вызывать заболевание. Мутантный штамм аскомицетного гриба *Leptosphaeria maculans*, у которого отсутствует изоцитратлиаза, вызывал более медленное полегание сеянцев рапса (черная ножка рапса), чем дикий тип. У *Magnaporthe oryzae*, делеция гена *ICL1*, кодирующего изоцитратлиазу, вызывает задержку в развитии симптомов заболевания.

У эктомикоризного базидиомицета *Laccaria bicolor* были обнаружены все гены, значимые для глиоксилатного цикла. Специализированные пероксисомы, имеющие ферменты глиоксилатного цикла, называют глиоксисомами. У грибов этот цикл важен не только как утилизация источника углерода, но и для патогенеза, развития и вторичного метаболизма.

10.2.3. Особенности метаболизма дрожжей

Дрожжи могут быть разделены на две группы по способности к осуществлению и регуляции спиртовой ферментации: *облигатные аэробы*, то есть дрожжи, которые не способны к алкогольной ферментации, и факультативные аэробы, дрожжи, способные к образованию спирта. *Факультативные аэробы* могут быть разделены на дрожжи, которые вызывают алкогольную ферментацию при низкой концентрации кислорода, и дрожжи, которые образуют этанол в процессе аэробного культивирования в колбах при росте на среде с высоким содержанием глюкозы, то есть так называемый Crabtree effect.

Представители облигатных аэробов: *Pichia anomala*, *P. stipitis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans*, *C. utilis*, *Kluyveromyces* spp.

Факультативные аэробы: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schisosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Dekkera bruxellensis*.

Все дрожжи могут утилизировать глюкозу как источник углерода (рис. 110). У многих дрожжей глюкоза транспортируется через мембрану путем облегченной диффузии. Облегченная диффузия происходит с помощью мембранного белка пермеазы при наличии концентрационного градиента без затрат энергии. Описана также энергетически зависимая система H^+-симпорта. Внутриклеточная глюкоза фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата, который далее распределяется между путями ЭМП, ГМФ и синтезом трегалозы (рис. 110). Участие и протекание ГМФ пути регулируется потребностями клетки в восстановленном

НАДФН, требующемся в биосинтетических реакциях.

Большая часть глюкозо-6-фосфата используется в пути ЭМП, который представляет собой серию реакций, приводящих к образованию пирувата (3) (рис. 110). В точке ответвления от пирувата углерод распределяется между дыхательным и ферментирующим путями. У пирувата имеется три возможности быть метаболизированным, зависящие от вида дрожжей и условий окружающей среды. В аэробных условиях пируват транспортируется в митохондрии, где превращается в ацетил-СоА при участии пируватдегидрогеназного ферментного комплекса. Ацетил-СоА далее окисляется в цикле трикарбоновых кислот. В процессе дыхания интермедиаты цикла Кребса удаляются как строительные вещества для клеточной биомассы. Чтобы избежать полного использования углерода, он должен восполняться через анаэробные реакции, одна из которых — образование оксалоацетата из цитоплазматического пирувата (5). Кроме того, в процессе ферментирующих реакций пируват декарбоксилируется до ацетальдегида при участии фермента пируватдекарбоксилазы. Ацетальдегид может либо быть в дальнейшем восстановлен (присоединение водорода) до этанола при участии алкогольдегидрогеназы (7) или окислен (отнятие водорода) до ацетата альдегиддегидрогеназой (8).

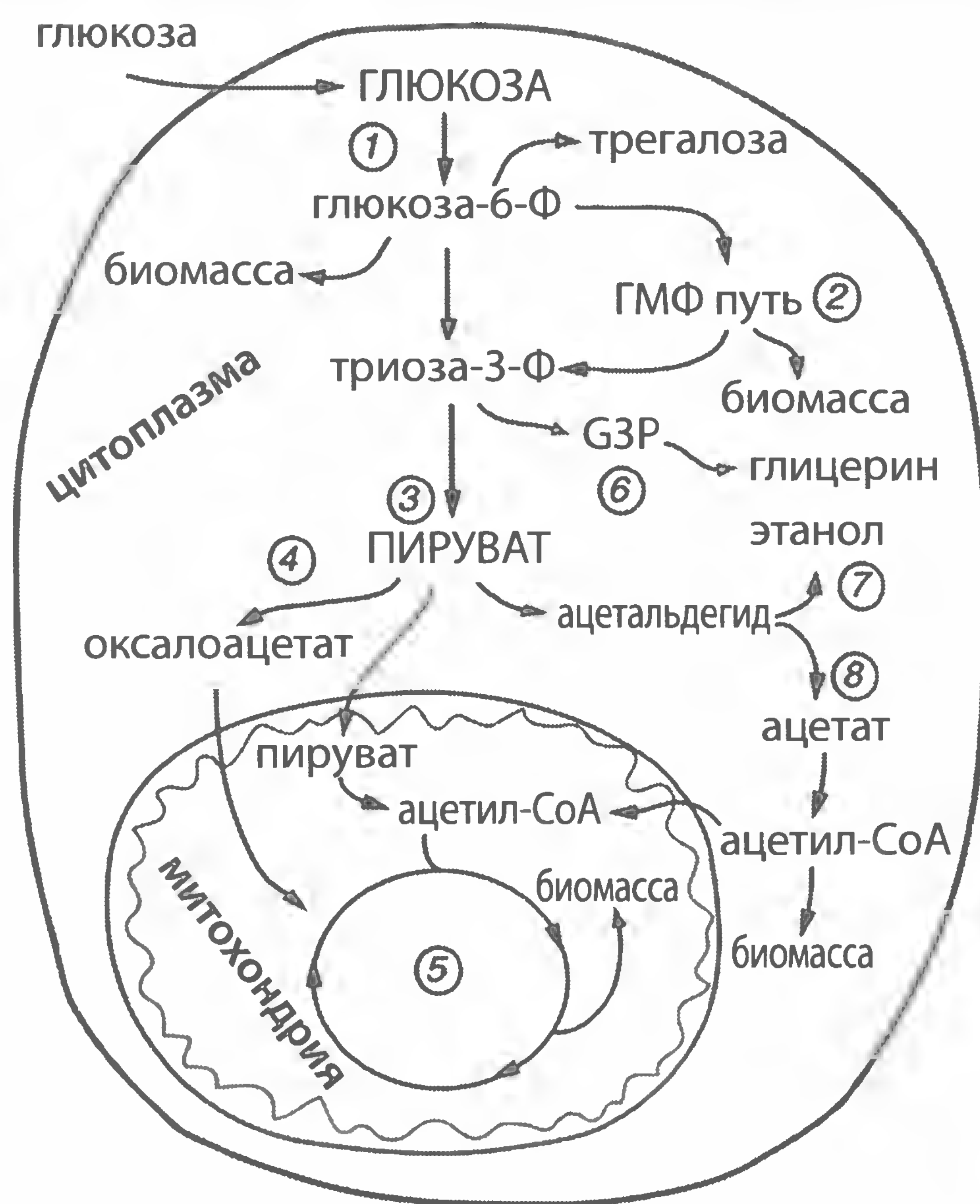


Рис. 110. Схема главных путей метаболизма углерода у дрожжей:
(1) фосфорилирование глюкозы, (2) пентозофосфатный путь, (3) точка ветвления для пирувата, (4) анаплеротическая продукция оксалоацетата, (5) цикл трикарбоновых кислот, (6) реокисление НАДН при образовании глицерина, (7) продукция этанола из ацетальдегида, (8) продукция ацетата из ацетальдегида. Для упрощения продукция и расходование АТФ, НАДН и CO_2 не включены в схему. G3P – глицерин-3-фосфат (Fredlund, 2004).

Главная цель диссимиляции сахара — образование энергии в форме АТФ, которая используется для синтеза компонентов дрожжевой биомассы. Однако в процессе расщепления глюкозы, АТФ также расходуется при фосфорилировании глюкозы и фруктозы (2 молекулы АТФ на фосфорилирование 1 молекулы глюкозы в гликолитическом пути).

Поддержание окислительно-восстановительного баланса клетки отражает поддержание метаболической активности. В процессе роста дрожжей $НАД^+$ восстанавливается до НАДН в цитоплазме и в митохондриях. Поддержание редокс баланса $НАД^+$ осуществляется путем реокисления НАДН. Цитозольный НАДН реокисляется разными путями при аэробных и анаэробных условиях. В присутствии кислорода он окисляется при помощи наружных НАДН-дегидрогеназ, локализованных на внутренней мембране митохондрий. В бескислородных условиях кофактор окисляется в метаболическом пути образования этанола из ацетальдегида (7). НАД-кофакторы восстанавливаются при гликолизе и в процессе образования биомассы. Образовавшийся НАДН при формировании биомассы может быть реокислен у дрожжей на первой ступени синтеза глицерина в реакции восстановления ди-

оксиацетонфосфата до глицерин-3-фосфата (6).

Метаболические пути углеводного обмена в целом схожи у разных дрожжей, что дает основание говорить, по меньшей мере, об однородности по метаболизму углеводов этой группы организмов.

Регуляция биохимических путей осуществляется на уровнях:

✓ Синтеза фермента — индукция, репрессия, дерепрессия (экспрессия гена)

✓ Активности фермента (аллостерическая активация, ингибирование изоэнзимов).

✓ Компартментализации — локализация метаболических путей (цитозоль, митохондрии, пероксисомы, вакуоль)

✓ Транспортных механизмов (секреция, распределения между разными клеточными компартментами и т.д.)

Синтез структурных полисахаридов дрожжей маннанов, глюканов и хитина происходит при участии сахаронуклеотидов как субстратов.

10.2.4. Метаболизм трегалозы

Трегалоза — невосстанавливающий дисахарид (α-D-глюкопиранозил-α-D-глюкопиранозид, α,α,-1,1-диглюкоза), состоит из двух альфа связанных остатков глюкозы. Синтез трегалозы у бактерий и дрожжей проходит через трегалозо-синтазный комплекс. Трегалоза синтезируется в два этапа: трегалозо-фосфат синтезируется у дрожжей из глюкозо-6-фосфата и УДФ-глюкозы с помощью трегалозо-6-фосфатсинтазы и превращается в трегалозу при участии фосфатазы. Расщепление трегалозы до глюкозы у дрожжей осуществляется трегалазой. Реакция, катализируемая ферментом трегалозофосфорилазой, вызывает деградацию трегалозы на молекулу глюкозы и глюкозо-1-фосфата. Фермент трегалозофосфорилаза уникален в метаболизме трегалозы, благодаря двум своим свойствам: Он способен:

✓ Катализировать как деградацию, так и синтез трегалозы,

✓ Синтезировать трегалозу без образования трегалозо-6-фосфата.

Дисахарид трегалоза вносит большой вклад в осмотическую стабилизацию клеток грибов и образует эндогенный резерв углерода, который активно метаболизируется даже в присутствии экзогенных субстратов. Природа и оборот этого резервного пула углерода зависят от условий роста и могут варьировать на разных стадиях жизненного цикла.

Длительное время трегалозу у грибов считали только запасным компонентом, но недавно у нее были открыты свойства стрессового протектанта. У *S. cerevisiae* была показана связь между индукцией генов, отвечающих за синтез трегалозы, и условиями, вызывающими стресс, такими как высокая температура, обезвоживание и радиация. У пивных дрожжей накопление трегалозы происходит в аскоспорах. У *S. cerevisiae* трегалоза накапливается в стационарной фазе роста, при росте на неферментируемых источниках углерода. Однако у нескольких винных штаммов *S. cerevisiae* происходит накопление трегалозы в процессе сбраживания глюкозы. Уровень накопления трегалозы коррелирует с повышением устойчивости к спирту. В одной из моделей молекулярных механизмов хронологического старения (подробнее см. гл. 11 «Старение») у *S. cerevisiae* трегалоза регулирует процессы упаковки белков, их защиты от окислительного стресса и агрегации у хронологически «старых» и «молодых» клеток дрожжей. Корреляция между накоплением трегалозы и толерантностью к спирту была показана для дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*. В клетках дрожжей *Pichia anomala* трегалоза накапливается при ограниченном доступе кислорода и остается на этом уровне в стационарной фазе роста. Возможно, трегалоза участвует в специфическом стрессовом ответе к условиям гипоксии.

Трегалоза служит у *Agaricus bisporus* резервным углеводом, который используется при особых условиях, таких как формирование плодовых тел (ПТ). Предполагается, что этот сахар транспортируется из мицелия в ПТ. Было продемонстрировано, что в отличие от ман-

нитола, уровень трегалозы в мицелии *A. bisporus* падает с 5% (стадия 2, зачаточное ПТ) до 1-2% (стадия 7, зрелое ПТ) в процессе плодообразования. Экспериментально было показано, что уровень трегалозы в мицелии достигает максимума между волнами плодоношения и снижается в процессе роста и агрегации мицелия.

Фермент трегалозофосфорилаза был обнаружен у ограниченного числа бактерий, грибов, включая дрожжи *Pichia fermentans* и базидиомицет *Flammulina velutipes*, а также у зеленой водоросли *Euglena gracilis*. У *F. velutipes* трегалозофосфорилазная активность была в мицелии и в спорофорах выше, чем трегалазная активность. В ПТ уровень активности трегалозофосфорилазы в 12 раз превышал активность трегалазы, что указывает на возможное участие этого фермента в деградации трегалозы в ПТ. В процессе развития ПТ активность трегалозофосфорилазы в 2–3 раза выше в ПТ по сравнению с мицелием, уровень трегалозы в этот период развития культуры снижается. Быстрое снижение трегалозы в процессе волны плодоношения согласуется с увеличением деградационной активности трегалозофосфорилазы и освобождением гексоз для гликолиза и ГМФ пути, что сопровождается образованием НАДФН для синтеза маннитола. Показано, что синтетическая активность трегалозофосфорилазы увеличивается в процессе развития стерильной культуры шампиньона двуспорового, что согласуется с увеличением количества трегалозы, наблюдаемом Дж. Хеммондом и Р. Николсом.

У фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* трегалоза служит протекторным веществом при тепловом стрессе и является важным, но не специфическим источником углерода в случае прорастания спор при низкой концентрации питательных веществ в среде. Получено доказательство роли трегалозо-6-фосфата как регулятора гликолиза в процессе прорастания спор.

10.2.5. Метаболизм гликогена

У *S. cerevisiae,* как и у других грибов, гликоген образуется при участии гликогенсинтазы, обеспечивающей последовательное добавление глюкозных единиц от УДФ-глюкозы с образованием линейной молекулы с α-1,4-связями, и фермента, отвечающего за образование α-1,6-точек ветвления. Расщепление гликогена до глюкозо-1-фосфата происходит при участии гликогенфосфорилазы. Гликогенсинтаза и гликогенфосфорилаза встречаются в активной и неактивной формах, переключение между которыми происходит за счет фосфорилирования и дефосфорилирования. Высокая концентрация глюкозо-6-фосфата стимулирует фосфорилирование и сопутствующую активацию гликогенсинтазы, но дефосфорилирование и сопутствующую инактивацию гликогенфосфорилазы.

Следует обратить внимание, что гликоген и трегалоза альтернативны друг другу. Гликоген синтезируется в течение периода активного роста, особенно при высоком отношении C/N в среде и расщепляется в течение стационарной фазы или в процессе образования покоящихся структур. В спорах и в клетках на стационарной фазе он явно замещается трегалозой, которая, в свою очередь, расщепляется при возобновлении роста или прорастания. Трегалоза очень важна в качестве протектанта при различных видах стрессов. Такая защита не обеспечивается гликогеном.

10.3. Метаболизм полиолов

В мицелии видов рода *Aspergillus* и других грибов, кроме трегалозы, присутствуют низкомолекулярные растворимые сахароспирты (=полиолы).

Главные черты метаболизма углерода у грибов изображены на рис. 107. В процессе активного роста происходит значительное накопление полиолов (маннитол, арабитол и т.д.) независимо от метаболического пути — гликолиза (субстраты — глюкоза, сахароза) или глюконеогенеза (субстрат — ацетат). Размер пула полиолов находится под влиянием ис-

точника углерода и доступности кислорода. Метаболический контроль метаболизма полиолов слабо изучен. Биосинтез маннитола у грибов может происходить при восстановлении фруктозо-6-фосфата (рис. 111). Обе НАД- и НАДФ- зависимые маннитол-1-фосфатдегидрогеназы, также как и маннитолдегидрогеназа обнаруживаются иногда одновременно. Хорошим кандидатом на регуляторную роль в описываемом процессе может быть фермент фосфофруктокиназа. Гликолитический рост происходит в присутствии сахарозы или смеси сахарозы и ацетата. Помимо накопления маннитола происходит накопление эритритола, уровень которого зависит от уровня кислорода. Синтез эритритола предпочтительнее при функционировании гликолиза, чем глюконеогенеза. Накопление арабитола и глицерина при одних и тех же условиях роста показывает, что потоки через ГМФ путь и путь ЭМП высоки и являются результатом высокой восстановительной активности, приводящей к накоплению полиолов.

Рассмотрим метаболизм полиолов на примере маннитола у культивируемого шампиньона *Agaricus bisporus*. Маннитол — шестиатомный сахароспирт, образующийся у *A. bisporus* как главный запасной углевод (30–50%) на ранних стадиях развития ПТ. В пластинках шляпки его количество снижается до 14–23%, в мицелии он составляет только 3–4% от сухого веса. У шампиньона двуспорового маннитол образуется путем восстановления фруктозы при участии маннитолдегидрогеназы и кофермента НАДФН (рис. 111). Маннитол в процессе развития ПТ шампиньона, вероятно, выполняет функцию осмотика, обеспечивая градиент осмотического давлении между спорофором и вегетативным мицелием, таким образом, управляя потоком воды и увеличивая тургорное давление, которое обеспечивает растяжение клеток и рост ПТ. Уровень трегалозы при развитии ПТ снижается с 5 до 1% от сухого веса.

Продукция НАДФН, участвующего в конверсии фруктозы в маннитол у *A. bisporus*, регулируется ГМФ путем через фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Активность фермента маннитолдегидрогеназы увеличивается в 2–3 раза на стадии формирования зачаточных плодовых тел по сравнению с этой активностью в мицелии. Снабжение фруктозой также может быть ключевой точкой в синтезе маннитола. Фруктоза образуется из фруктозо-6-фосфата путем удаления фосфата с участием кислой фосфатазы. По предположению Мортона с сотр. реакция дефосфорилирования может быть также контрольной точкой. При добавлении фруктозы в среду роста мицелия с ПТ она сразу превращается в маннитол. Это может быть связано с конкуренцией между фруктозо-6-фосфатазой и фосфофруктокиназой, определяющей соотношение долей участия фруктозо-6-фосфата в гликолизе и в синтезе маннитола, что в значительной степени зависит от АТФ статуса клетки.

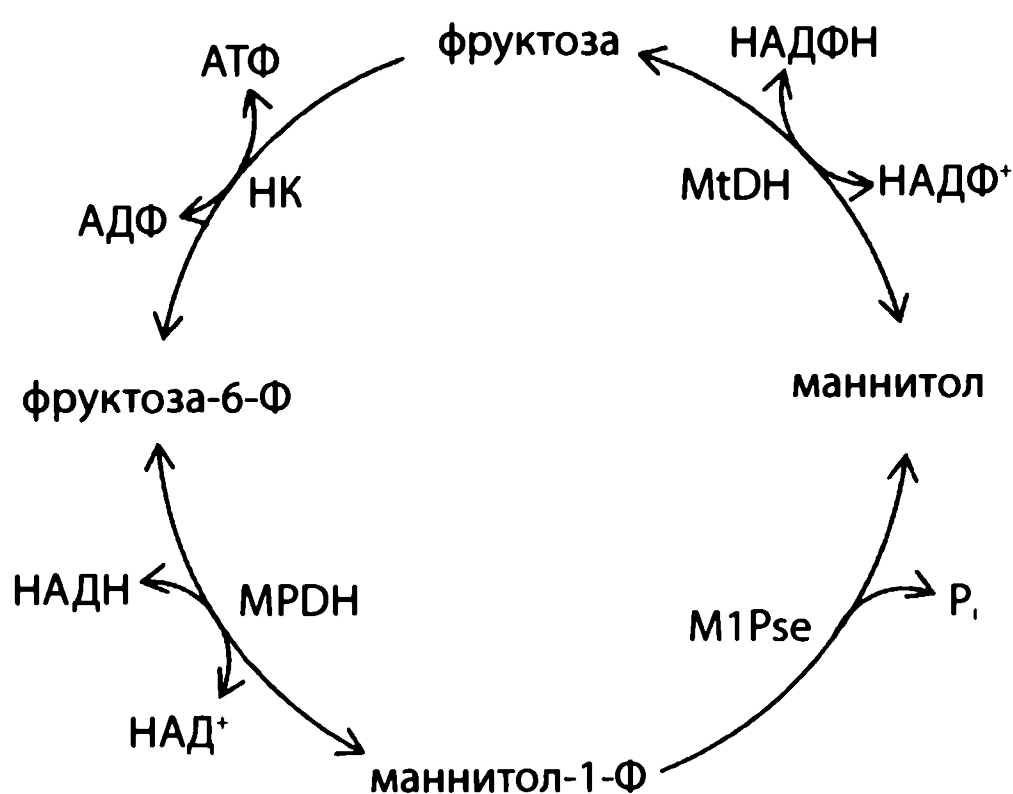


Рис. 111. Предполагаемый цикл маннитола у грибов. Обозначения: НК — гексокиназа; MPDH — маннитол-1-фосфат-5-дегидрогеназа; M1Pse — маннитол-1-фосфатаза; P_i — неорганический фосфат; MtDH — маннитолдегидрогеназа (Hult, Gatenbeck, 1978). Пояснения см. в тексте.

Х. Стоп и Дж. Мойбрек клонировали и охарактеризовали маннитолдегидрогеназную кДНК из шампиньона двуспорового. Ими было показано, что уровень транскрипта выше в ПТ, полученных в условиях солевого стресса (150 мМ NaCl добавляли в покровную смесь) по сравнению со стандартно выращенными ПТ. При развитии ПТ в условиях солевого стресса требуется более высокий уровень маннитола для увеличения осмотического потенциала в клетках

и обеспечения потока воды, необходимого для роста ПТ. Уровень маннитола в условиях солевого стресса достигал 60%. Специфическая активность маннитолдегидрогеназы была также выше в ПТ, полученных в условиях солевого стресса. Кальберер показал в своих опытах, что добавление соли в покровную смесь растущих П., увеличивало осмотическую активность таких веществ, как маннитол, тормозило развитие ПТ и снижало их урожай (при этом градиент воды уменьшался). Поэтому можно предположить, что маннитол функционирует как осморегуляторный компонент, отвечающий за поток воды из компоста для поддержания тургора и развития ПТ. Маннитол, по-видимому, не транспортируется из мицелия, а синтезируется в ПТ, так как активность маннитолдегидрогеназы в них выше, чем в мицелии.

Активность ферментов, участвующих в образовании маннитола, обнаружена у многих микоризообразующих базидио- и аскомицетов, а также у не микоризообразующих базидиомицетов.

10.4. Метаболизм липидов

Липиды образуют компоненты клеточных мембран, играют важную роль в разных биологических процессах, включая запасание энергии, и могут действовать, как предшественники синтеза гормонов и как сигнальные молекулы. Биосинтез липидов или липогенез у грибов не отличается от других эукариот и происходит в цитоплазме при участии предшественника ацетил-СоА. Метаболизм липидов тесно связан с углеводным метаболизмом, так как ацетил-СоА является общим интермедиатом для метаболизма липидов и углеводов. Некоторые дрожжи и мицелиальные грибы запасают значительное количество липидов в форме триацилглицеринов, которые могут составлять от 20 до 70% сухой массы клеток. Такие продуценты жирных масел (масляные грибы) представляют интерес как объекты программы развития биотоплив (*биодизель*).

10.4.1. Метаболизм триацилглицеринов

Основой практически всех жирных масел являются триацилглицерины (ТАГ) — сложные эфиры трехатомного спирта глицерина, все ОН-группы которого этерифицированы остатками жирных кислот (ЖК).

10.4.1.1 Биосинтез триацилглицеринов (рис. 112)

Жирные ацил-СоА образуются в результате *de novo* синтеза эфиров глицерина или стерола с образованием триацилглицерина (ТАГ) и стерилового эфира (СЭ) соответственно. У масляных грибов нейтральные липиды СЭ и ТАГ запасаются внутри липидных тел (ЛТ или олеосом). ТАГ образуются последовательным ацилированием глицерин-3-фосфата (Г3Ф), катализируемым разными ацил-трансферазами. Г3Ф образуется из глицерина под действием глицеринкиназы или может быть синтезирован из дигидроксиацетонфосфата (ДГАФ) при участии глицерин-3-фосфат (Г3Ф)-дегидрогеназы в обратимой реакции. Акцептором ацильной группы у *S. cerevisiae* может быть Г3Ф и ДГАФ. Добавление одной ацильной группы к Г3Ф приводит к образованию лизофосфатидной кислоты (ЛФК). ЛФК может также образовываться путем восстановления ацил-ДГАФ, катализируемого НАДФН-зависимой редуктазой. Вторая ацилтрансфераза присоединяет другую ацильную группу, образуя 1,2-диацил Г3Ф (фосфатидную кислоту, ФК).

Фосфат удаляется из ФК изоферментом фосфатидат-фосфатазой, образующим диацилглицерин (ДАГ). ДАГ может быть непосредственно предшественником ТАГ или использоваться в биосинтезе фосфолипидов (рис. 112).

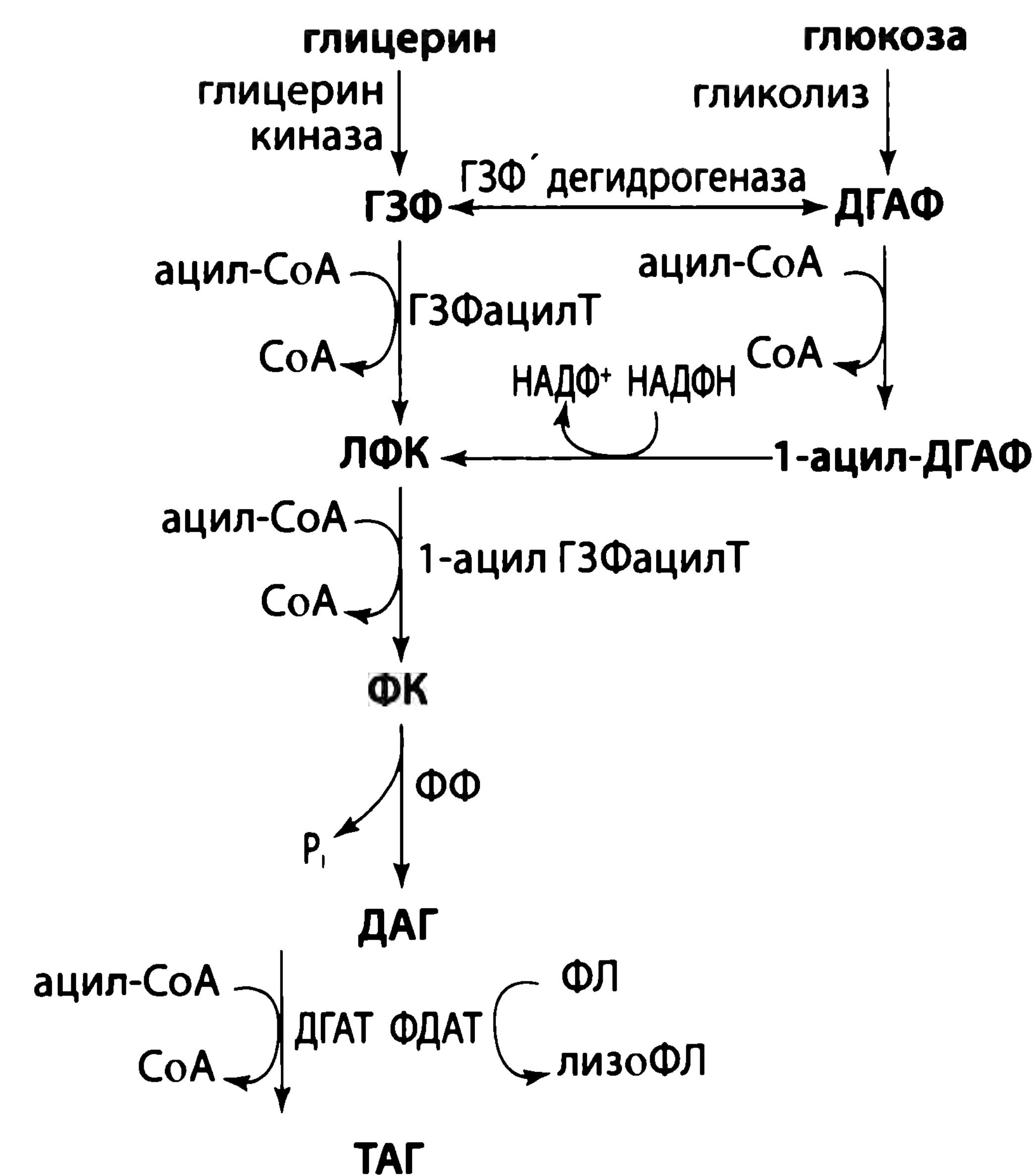


Рис. 112. Синтез триацилглицеринов.
Обозначения: Г3Ф — глицерин-3-фосфат, Г3Ф ацилТ — глицерин-3-фосфат ацилтрансфераза, ДАГ — диацилглицерин, ДГАТ — диацилглицерин-ацилтрансфераза, ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат, ЛФК — лизофосфатидная кислота, ЛФЛ — лизо-фосфолипид, ТАГ — триацилглицерины, ФДАТ — фосфодиацилтрансфераза, ФК — фосфатидная кислота ФФ — фосфатидатфосфатаза, P_i — фосфат неорганический (Czabany et al., 2007). Пояснения см. в тексте.

Последняя ступень синтеза *de novo* ТАГ может осуществляться с помощью разнообразных ацил-доноров, например, ацил-CoA или фосфолипидов. В первом случае ДАГ-ацилтрансфераза (ДГАТ), которая является интегральным белком ЭР, может напрямую присоединить третий ацил-CoA. Фермент ДГАТ присутствует у *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica* главным образом в стационарной фазе, хотя он экспрессируется также и в течение экспоненциальной фазы роста. Во втором случае ДГАТ, экспрессируемая более активно в экспоненциальной фазе роста, была идентифицирована у *Y. lipolytica.* У *S. cerevisiae* фосфолипид: ДАГ-ацилтрансфераза (ФДАГ), использующая в качестве ацил-доноров фосфолипиды, локализована в ЭР, в то время как у *Y. lipolytica* она присутствует и в ЭР, и на поверхности липидных тел.

10.4.1.2. Биогенез липидных тел (рис. 113)

У эукариот нейтральные липиды запасаются в специальных компартментах, известных как липидные тела (ЛТ). Они собираются как специализированный субдомен ЭР. Нейтральные липиды откладываются между двумя слоями мембранного бислоя. Однако значительное количество нейтральных липидов не может быть встроено в бислой мембран ЭР и продолжительный синтез нейтральных липидов приводит к формированию выростов, которые отпочковываются от ЭР как зрелые липидные тела после достижения критического размера (рис. 113). У большинства масляных дрожжей нейтральные липиды состоят в основном из ТАГ (90% и более), небольшая фракция представлена СЭ. Присутствие значительного количества свободных жирных кислот с липидными телами известно только для *Y. lipolytica*. У *S. cerevisiae*, которые накапливают меньше 15% липидов от своей биомассы, ЛТ содержат сходные количества ТАГ и СЭ.

ЛТ состоят из нейтральных липидов, которые окружены фосфолипидным монослоем, куда встроено несколько белков. Эти белки играют ключевую роль в липидном метаболизме, биосинтезе и переносе субстрата. По необходимости запасные липиды расходуются из этих компартментов при участии триацилглицерин-липаз и СЭ-гидролаз. Соответственно продукты деградации служат источником энергии и/или строительным материалом для формирования мембран. Гидролизованные жирные кислоты из ТАГ или СЭ либо направ-

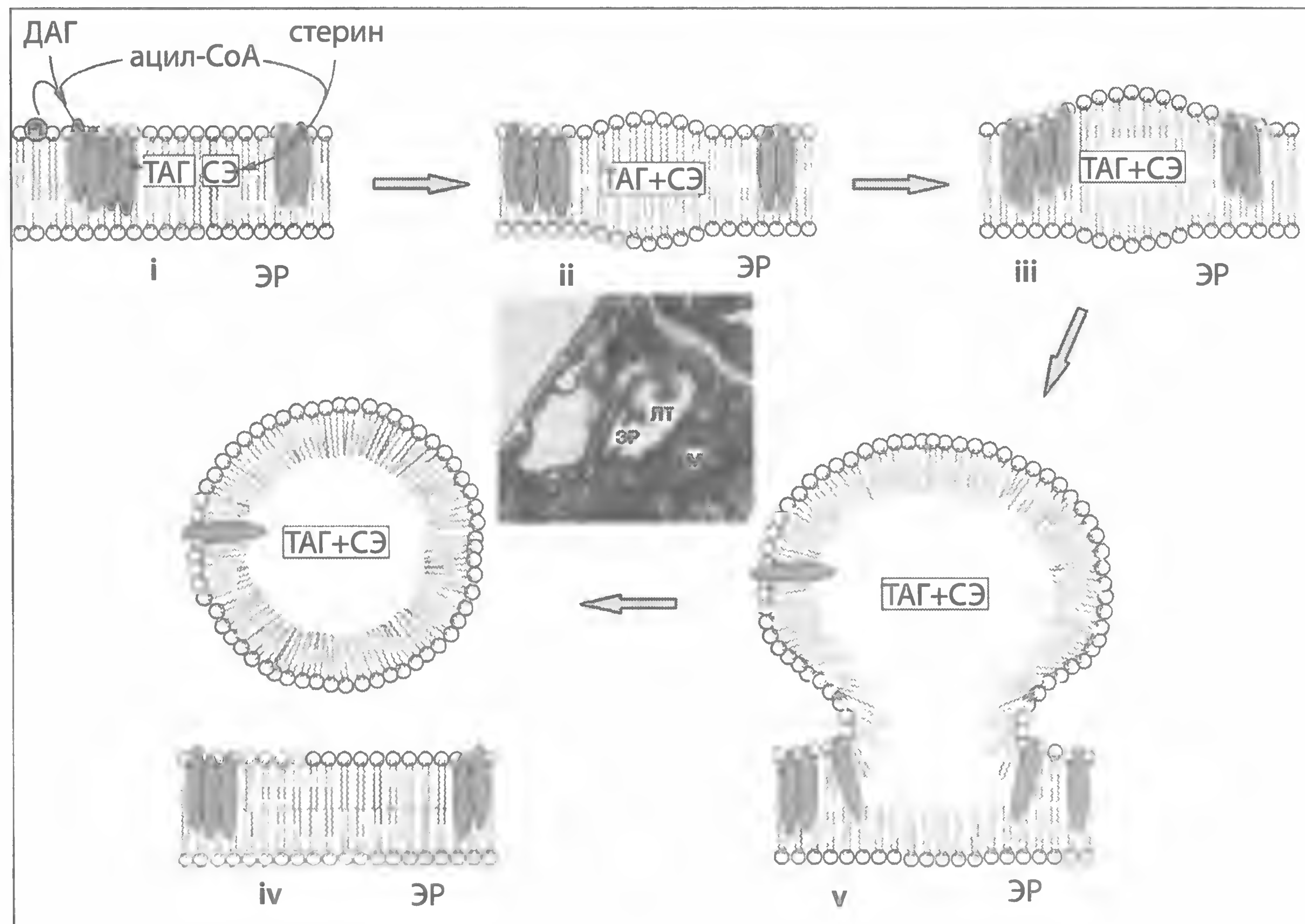


Рис. 113. Образование липидных тел (ЛТ) из мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР). ДАГ превращается в результате ацилирования в ТАГ и вместе с СЭ накапливается внутри фосфолипидного бислоя ЭР (i–iii). Образующиеся микропузырьки (iii, iv) превращаются в липидные тела (v) На вставке в центре схемы фото цистерны ЭР и вновь образовавшееся липидное тело у *Pleurotus pulmonarius* (фото автора). Обозначения: ДАГ — диацилглицерин, М — митохондрия, СЭ — стериловый эфир, ТАГ — триацилглицерин, PL — фосфолипид (Czabany et al., 2007).

ляются к пероксисомам, где подвергаются β-окислению, либо расходуются на биосинтез фосфолипидов.

10.4.1.3. Гидролиз триацилглицерина

Первая ступень деградации триацилглицерина — это гидролиз при участии триацилглицерин-липазы с образованием глицерина и жирных кислот. Далее происходит окисление жирных кислот до ацетил-CoA в процессе β-окисления. Липазы необходимы для гидролиза триацилглицерина и СЭ, запасаемых в липидных телах.

10.4.2. Жирные кислоты

Жирные кислоты выполняют в клетках грибов и других эукариот разнообразные биологические функции. Они являются составляющими нейтральных и полярных липидов, частью молекул вторичных мессенджеров, боковыми цепями некоторых коэнзимов и вторичных метаболитов, образуют ковалентные связи с разными белками эукариот, выполня-

ют центральную роль не только как запасной источник энергии, но и в сборке и динамике биологических мембран, а также в контроле клеточного метаболизма и физиологии клетки. В связи с этим, способность синтезировать жирные кислоты *de novo* является элементарной способностью большинства клеток.

10.4.2.1. Биосинтез жирных кислот (ЖК) (рис. 114)

Большинство организмов способны синтезировать длинные цепи (C12:0–C16:0) насыщенных жирных кислот *de novo* из ацетил- и малонил-CoA в реакции, состоящей из семи каталитических стадий (рис. 114). Хотя начальные и конечные реакции могут варьировать, циклические серии цепной реакции удлинения, по существу, одинаковы для всех организмов. Жирнокислотная цепочка стартует с 2-углеродной цепи ацетил-CoA. Удлинение цепи жирной кислоты происходит путем последовательного присоединения к ацил-КоА двууглеродных фрагментов при участии малонил-CoA и НАДФН. Когда достигается необходимая длина, синтез жирной кислоты заканчивается. Каждый цикл удлинения цепи включает 5 реакций с соответствующей ферментативной активностью: малонилтрансферазы (EC: 2.3.1.39), кетоацилсинтазы (EC: 2.3.1.41), кетоацилредуктазы (EC: 1.1.1.100), 3-гидроксиацилдегидратазы (EC: 4.2.1.58, 4.2.1.59 и 4.2.1.61) и еноил-ацил редуктазы (EC: 1.3.1.10). У дрожжей биосинтез жирных кислот завершается освобождением молекул жирных ацил-CoA из мультиферментного комплекса, синтазы жирных кислот (ЖКС), который осуществляет биосинтез жирных кислот *de novo*. Пальмитоил- (C16) и стеароил-CoA (C18) являются главными продуктами у дрожжей, в то время как миристоил-CoA (C14) образуется в небольшом количестве. Для синтеза пальмитоил-CoA (C16) необходимы одна молекула ацетил-CoA и 7 молекул малонил-CoA. Для удлинения субстрата малонил-CoA синтезируется путем карбоксилирования ацетил-CoA биотин-содержащим ферментом, ацетил-CoA карбоксилазой (Acc1p, EC 6.4.1.2). Ацетил-CoA карбоксилаза активируется биотин-апопротеин лигазой (Bpl1p).

Существует два типа ЖКС в зависимости от организации каталитического центра. Грибы, животные и некоторые бактерии имеют ЖКС типа I, которые представляют собой крупные мультифункциональные белки и содержат все необходимые сайты каталитической активности для биосинтеза жирных кислот на одном полипептиде (alpha) или на двух полипептидах (alpha и beta). Грибная ЖКС это alpha(6)beta(6) гетерододекамер, ЖКС животных — alpha(2) гомодимер, а некоторые бактериальные ЖКС типа I — alpha(6). Бактерии, растения и митохондрии, с другой стороны, имеют ЖКС типа II, которые представляют собой сравнительно независимые белки, где каждый белок катализирует одну ступень в циклической серии реакций.

Дрожжевой комплекс ЖКС катализирует всего 8 реакций. Альфа субъединица (Fas2p) катализирует 3 реакции, используя активности кетоацилсинтазы (EC: 2.3.1.41), кетоацил-редуктазы (EC: 1.1.1.100) и само-пантетеинилирование, а дрожжевая beta субъединица (Fas1p) катализирует 5 реакций, представленных ферментами: ацилтрансферазой (EC 2.3.1.38), малонилтрансферазой (EC: 2.3.1.39), 3-гидроксиацилдегидратазой (EC: 4.2.1.58, 4.2.1.59 и 4.2.1.61), еноил-ацилредуктазой (EC: 1.3.1.10) и пальмитоилтрансферазой (EC:2.3.1.-).

Активность ЖКС регулируется на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. У дрожжей ЖКС является «домашним» ферментом, который экспрессируется конститутивно на низком уровне, но его экспрессия активируется главными транскрипционными факторами дрожжей Rap1, Abf1 и Reb1 и инозитол/холиновым фактором, отвечающим за транскрипцию гетеродимера Ino2p-Ino4p. Координация экспрессии двух субъединиц регулируется Fas1p, контролирующей экспрессию Fas2. Соотношение субъединиц ЖКС в дальнейшем регулируется протеолитической деградацией лишних субъединиц. В то время как интактный мультимерный комплекс alpha(6)beta(6) ЖКС стабилен, его индивидуальные субъединицы быстро деградируют.

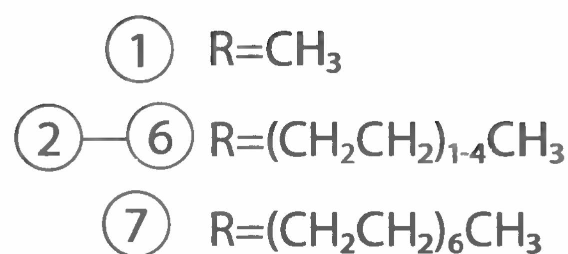


Рис. 114. Синтез жирных кислот у дрожжей с участием комплекса ферментов (синтазы жирных кислот). Обозначения: АТ — ацилтрансфераза, ДГ — дегидратаза, ЕПБ — еноил-ацил-переносящий белок, ЕР — еноилредуктаза, КР — кеторедуктаза, КС — кетоацилсинтаза, МПТ — малонил/пальмитоил трансфераза (http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/ban_group/FAS). Пояснения см. в тексте.

Базидиомицеты *Laccaria bicolor*, *Ustilago maydis* и *Coprinopsis cinerea* имеют синтазу типа I, как у животных. Эти три вида гриба по способу питания представляют собой симбионта, биотрофа и сапротрофа соответственно. Некоторые виды грибов показывают зависимый от местообитания биосинтез ЖК. Например, *Malassezia globosa* напрямую зависит от липидов хозяина, так как не имеет генов синтазы жирных кислот в своем геноме. С другой стороны, у *L. bicolor*, хотя гриб, по крайней мере, в симбиозе в основном опирается на своего хозяина как источник углерода, снижения числа генов, кодирующих ферменты биосинтеза ЖК, не наблюдается, так как все гены, требующиеся, по меньшей мере, для цитоплазматического биосинтеза ЖК, присутствуют. Показано, что в отличие от видов арбускулярно-микоризного рода *Glomus*, чьи синтазы жирных кислот, вероятно, активны только в мицелии внутри растения и не активны в свободном мицелии, эктомикориза *L. bicolor* может синтезировать пальмитиновую кислоту (16:0) и производные жирных кислот во всех тканях. Такое различие в метаболизме жирных кислот можно частично объяснить строго облигатной биотрофностью арбускулярно-микоризных грибов по сравнению с более гибким образом жизни эктомикоризных видов. Важным различием между свободным мицелием и эктомикоризой было примерно семикратное снижением олеиновой кислоты (18:1) в растительной ткани.

10.4.2.2. β-Окисление жирных кислот (рис. 115).

β-Окисление жирных кислот — это процесс расщепления длинной цепи молекулы ацил-СоА до молекулы ацетил-СоА. Благодаря этому процессу, образуется ацетил-СоА, а ацил-СоА укорачивается на 2 углерода и подвергается дальнейшему циклу β-окисления (рис. 115). Исследования на животных и мицелиальном грибе *Aspergillus nidulans* показали, что β-окисление происходит и в митохондриях, и в пероксисомах. Однако у дрожжей *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* и *Candida tropicalis* β-окисление происходит только в пероксисомах.

β-Окисление жирных кислот играет роль в физиологии апрессориума патогена риса *Magnaporthe oryzae*. Делеция гена *Δmfp1*, отвечающего за синтез многофункционального белка, связанного с β-окислением, приводит к значительному сокращению заболевания риса. Было показано, что у *Candida albicans* пероксисомальное β-окисление не требуется для вирулентности, однако оно необходимо для функционирования глиоксилатного цикла.

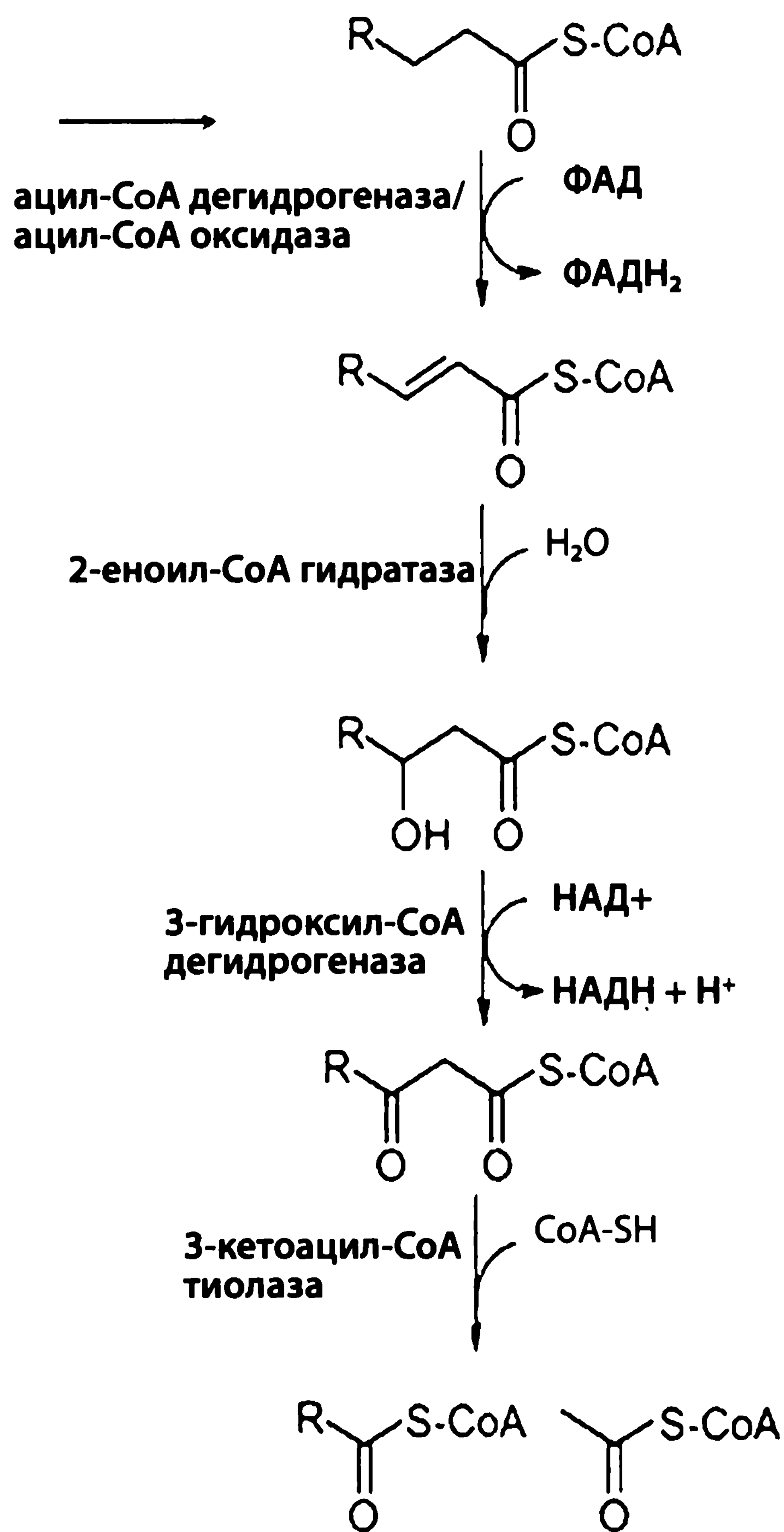


Рис. 115. β-Окисление жирных кислот (Maggio-Hall, Keller, 2004).

β-Окисление жирных кислот по месту локализации в клетке отличается у растений, животных и грибов. У растений и дрожжей оно происходит только в пероксисомах или глиоксисомах. У животных классический цикл β-окисления происходит в митохондриях, в то время как пероксисомы служат для специальной системы β-окисления при деградации или очень длинных, или разветвленных цепей жирных кислот. Найдено, что у *Laccaria bicolor* ферменты цикла β-окисления локализованы в митохондриях и пероксисомах. Обе органеллы участвуют в катаболизме ЖК (за некоторым исключением) у мицелиальных аскомицетов, базидиомицетов, зигомицетов и оомицетов. При этом митохондриальный цикл β-окисления отвечает за разрушение короткоцепочечных жирных кислот, в то время как пероксисомальный цикл используется для деградации длинноцепочечных жирных кислот. У *L. bicolor* вспомогательные ферменты для деградации ненасыщенных жирных кислот были локализованы исключительно в пероксисомах. У этого гриба были изучены два «стартовых» фермента, участвующих в разных циклах β-окисления, митохондриальная ацил-СоА дегидрогеназа и пероксисомальная ацил-СоА оксидаза. Это указывает на то, что *L. bicolor* имеет ферменты с разной специфичностью и может потреблять широкий круг липидов. Последняя функция может быть особенно важной, так как для *L. bicolor* характерен сапротрофный образ жизни.

10.5. Метаболизм азота

Метаболизм азота по своему значению не уступает углеродному метаболизму, хотя уступает ему по объему. Источник азота необходим грибам для роста и развития. При элементарном анализе мицелия грибов оказалось, что азота в его составе примерно в 5–6 раз меньше, чем углерода. Соединения углерода используются грибами в значительно большем количестве, чем вошедшие в состав мицелия, так как они служат источником энергии. Поэтому в состав питательных сред должно входить в десятки раз больше источника углерода, чем азота. Основная часть усвоенного азота остается в мицелии, тогда как от усвоенного углерода в клетках удерживается только небольшая часть.

У грибов азот входит в состав клеточной стенки гиф в форме хитина, полимера ацетилглюкозамина, а также в состав белков, пептидов, аминокислот, большинства витаминов и ферментов, в состав пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот.

Грибы могут утилизировать многие азотсодержащие компоненты как неорганические, так и органические. Аммоний, мочевина, аминокислоты и нитрат могут быть использованы в качестве единственного источника азота для роста мицелия грибов.

10.5.1. Ассимиляция неорганических источников азота

Аммоний усваивается большинством грибов и может использоваться в качестве единственного источника азота, многие грибы способны утилизировать нитрат или нитрит. Среди грибов, не способных усваивать нитраты, но потребляющие аммонийный азот, находятся зигомицеты (виды родов *Mucor*, *Rhizopus*), базидиомицеты (виды родов *Marasmius*, *Pleurotus*), дрожжи. Внутри клетки аммоний включается в аминокислоты посредством двух основных реакций Наиболее общая — восстановительное аминирование, включающая реакцию между аммонием и α-кетоглутаратом, катализируемую глутаматдегидрогеназой (рис. 116). Глутамат, образующийся в этой реакции, может затем реагировать в присутствии глутаминсинтетазы с другим ионом аммония с выходом глутамина (рис. 116). Дополнительно глутамат может действовать и как донор аминогрупп в реакции трансаминирования при синтезе большинства других клеточных аминокислот. В этом случае глутамат (иногда аспартат) передает свою аминогруппу на α-кетокислоту.

Грибы, усваивающие нитратный азот, обычно способны усваивать и нитритный азот. Сюда принадлежат грибы из группы аскомицетов, дейтеромицетов и некоторые дереворазрушающие базидиомицеты (опенок, шиитаке и др.).

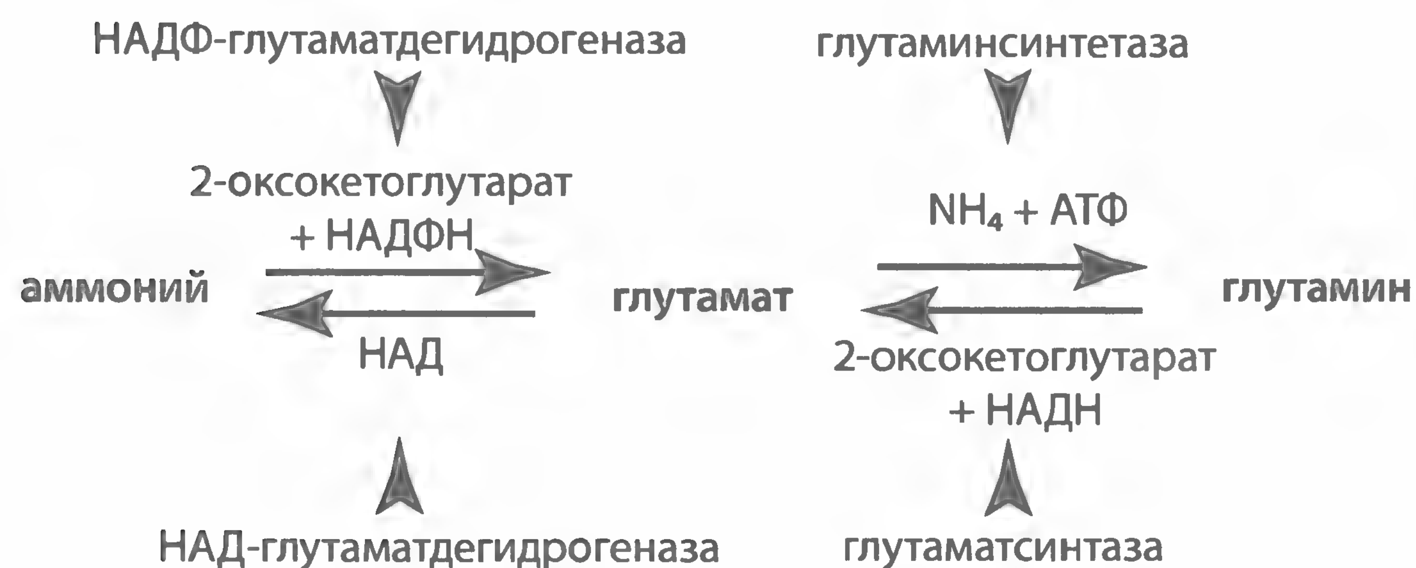


Рис. 116. Путь ассимиляции аммония у грибов. Взаимопревращения аммония, глутамата и глутамина, катализируемые НАДФ-глутаматдегидрогеназой, глутаминсинтетазой, глутаматсинтазой и НАД-глутаматдегидрогеназой, главные в метаболизме азота (Davis, Wong, 2010).

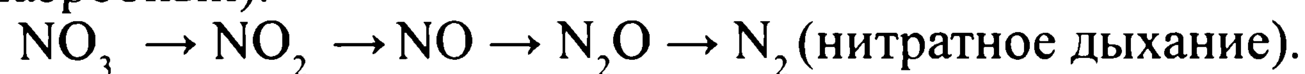
Грибы метаболизируют нитрат двумя путями. Один — ассимиляторный (восстановительный с использованием НАДН/НАДФН) путь, в котором NO_3^- используется как источник азота для последующего включения в биомассу мицелия.



$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+$

Ферментация аммония или восстановление нитратов (анаэробный процесс), а также обратный процесс превращения аммония в нитраты (нитрификация) происходят у многих почвообитающих грибов. Оценка способности к нитрификации у почвенных микроорганизмов показала, что грибы занимают одно из первых мест. На первом месте среди них *Aspergillus flavus*. Грибы предпочитают использовать нитрат в большей степени, чем нитрит.

Другой путь — диссимиляторный, в нем электроны с респираторных цепей передаются на нитрат, то есть нитрат используется как терминальный акцептор электронов (процесс анаэробный).



$NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (нитратное дыхание).

Денитрификация — превращение NO_3 в N_2. В процессах диссимиляторной денитрификации нитраты используются в качестве окислителя органических веществ вместо молекулярного кислорода, что обеспечивает микроорганизмы необходимой энергией. Эти энергетические процессы называются нитратным дыханием.

Многие почвенные грибы способны к денитрификации, хотя считалось ранее, что такой анаэробный процесс характерен только для прокариот. Грибная денитрифицирующая система локализована в митохондриях и функционирует подобно анаэробному дыханию у бактерий. У грибов эта система функционирует при ограниченном доступе кислорода (факультативные анаэробы). А при аэробных условиях у этих же грибов происходит дыхание и окислительное фосфорилирование. Примеры таких грибов, имеющих мультимодальное дыхание: *Fusarium oxysporum, Hyalodendron* sp., *Neurospora crassa, Penicillium abeanum, Petriella guttulata, Podospora carbonaria, Talaromyces rotundus, Trichophyton rubrum* и др.

10.5.2. Метаболизм аминокислот

Органический азот усваивается грибами в основном в форме аминного азота аминокислот, пептидов и белков. Белки и пептиды перед усвоением расщепляются пептидазами, а аминокислоты усваиваются целиком.

В клетках аминокислоты обычно служат донорами азота для синтеза более сложных молекул. Используемый в культуральной среде источник азота часто должен быть превращен внутриклеточно в первую очередь в аминокислоты до практического использования его организмом. Чаще всего источником азота в среде культивирования является аммоний, но может быть и нитратный источник азота (например, в среде Чапека). Углеродные скелеты для многих аминокислот являются интермедиатами гликолитичекого пути и цикла Кребса. Другие аминокислоты синтезируются прямо из глутамата или аспартата. Формируемые аминокислоты могут быть использованы в синтезе большого ряда молекул, таких как белки, витамины, нуклеиновые кислоты, хитин и некоторые фосфолипиды.

Аминокислота лизин не может синтезироваться животными, но среди других организмов существуют два различных пути биосинтеза этой аминокислоты (рис. 117). У оомицетов, также как в бактериях, различных водорослях и высших растениях лизин синтезируется конденсацией пирувата и аспартатсемиальдегида. Этот путь проходит через диаминопимелиновую кислоту (ДПК) и может быть назван ДПК-путь. У грибов лизин синтезируется из α-кетоглутарата и ацетил-КоА через α-аминоадипиновую кислоту (ААК) — ААК-путь. Эти два пути не имеют общих ферментов или интермедиатов и, вероятно, развивались независимо друг от друга. Предполагается, что при появлении в процессе эволюции наряду с

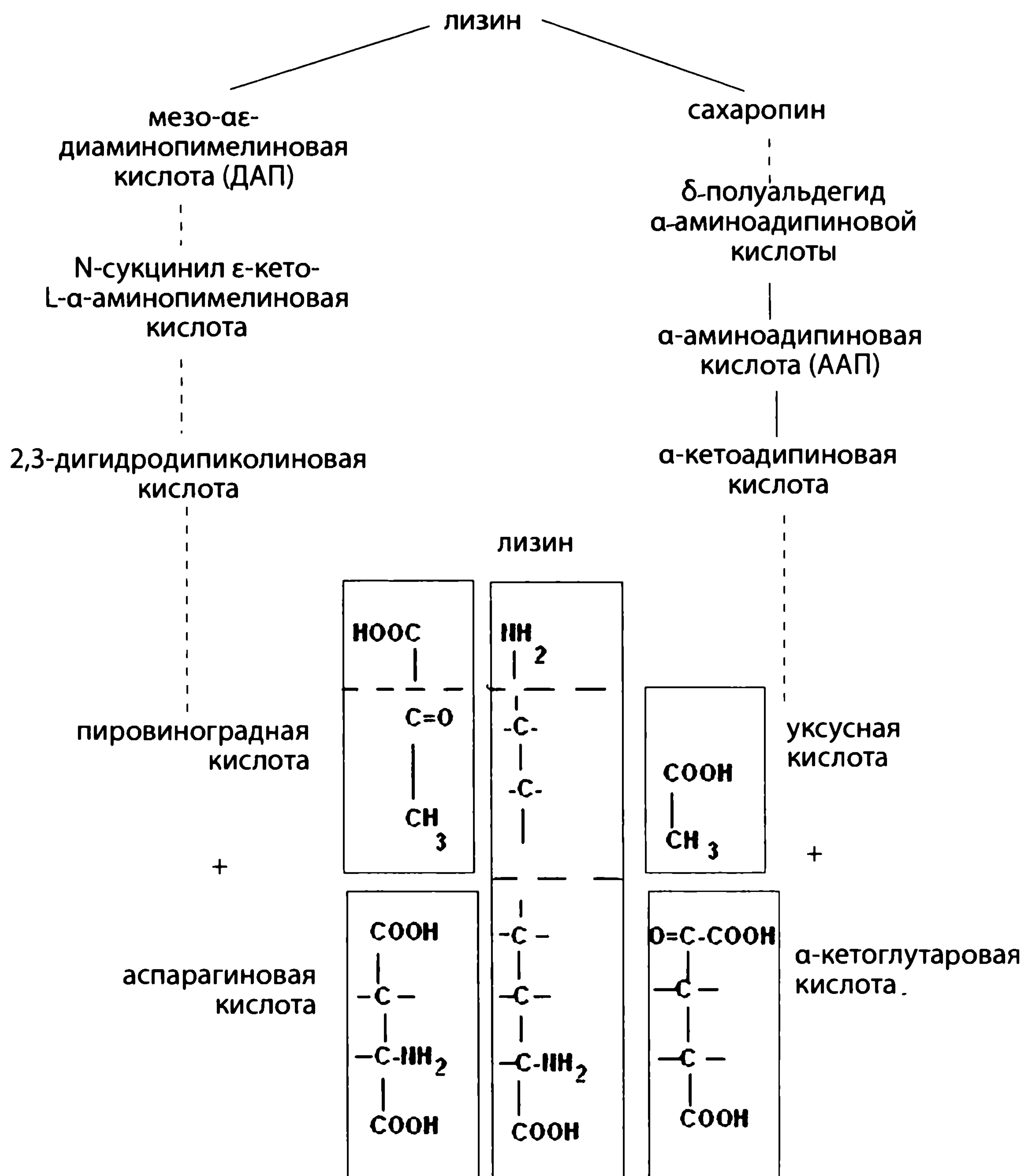


Рис. 117. Два пути биосинтеза лизина (Мюллер, Леффлер, 1995). Пояснения см. в тексте.

целлюлозными клеточными стенками стенок на основе хитина ДПК-путь был отбракован, как чем-то мешающий биосинтезу хитина.

Большинство грибов могут использовать непосредственно аминокислоты, как источник азота, но не все аминокислоты используются одинаково хорошо. Так, триптофан, лейцин и метионин — плохие источники азота как для роста, так и споруляции, серин, γ-аминобутират и глутамат — эффективные источники для обоих процессов, а орнитин и аргинин — хорошие источники для роста, но плохие для споруляции. В целом, аминокислоты с кислыми боковыми цепями являются наилучшими источниками как для роста, так и споруляции; с незаряженными полярными боковыми цепями — относительно хорошими, а те, что с неполярными боковыми цепями больше, чем метильная группа, наиболее плохими. Кроме того, показано, что тип и количество источника углерода в среде влияют на эффективность использования грибом доступного источника азота.

Аминокислоты составляют одну из наибольших и наиболее разнообразных групп веществ, транспортируемых через грибную мембрану. В связи с этим, ряд различных транспортных систем участвуют в потреблении этих важных азотистых соединений. При работе

на дрожжах, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus nidulans* выделены 3 группы транспортных систем: 1) система широкой специфичности, 2) системы, специфичные для кислых, нейтральных и основных аминокислот, 3) специфичные системы для одиночных аминокислот.

Общая транспортная система конститутивна и имеет у *S. cerevisiae* максимальный уровень активности, который в 5–50 раз превосходит активность любой специфической транспортной системы. Пролин, являющийся иминокислотой, этой системой не транспортируется. Для него существует собственный переносчик, который активируется в условиях дефицита азота или углерода.

Следует обратить внимание на ряд различных факторов, влияющих на потребление и накопление аминокислот. Так, pH воздействует на потребление, определяя заряды аминокислоты и переносчика и, таким образом, степень связывания между ними. Кроме того, общий механизм транспорта аминокислот у грибов — это протонный симпорт и, следовательно, достаточная концентрация ионов водорода требуется для необходимого грибу потребления. Хотя оптимум pH потребления индивидуальных аминокислот варьирует, в основном, этот процесс происходит наиболее быстро при pH 5–6.

Потребление питательных веществ зависит также и от температуры. Возрастание температуры от 5 до 30 °C приводит к заметному увеличению транспорта C^{14}-лизина у *P. chrysogenum*, однако при более высоких температурах скорость потребления резко падает, что может быть связано с белковой природой переносчика.

Так как транспорт аминокислот опосредован переносчиком, он характеризуется кинетикой насыщения. Таким образом, возрастание концентрации аминокислоты может приводить к возрастанию ее потребления при низких концентрациях, но не влиять на потребление при высоких концентрациях. Кроме того, различные аминокислоты могут транспортироваться одним и тем же переносчиком. В этом случае, степень использования одной аминокислоты по отношению к другой будет определяться их сравнительными концентрациями и сродством к переносчику.

Протонный симпорт (вторичный активный транспорт) является принципиальным способом потребления аминокислот у грибов. В связи с этим, химические или физические факторы, влияющие на продукцию и запасание энергии будут соответственно влиять и на транспорт аминокислот. Поэтому ингибиторы продукции энергии, такие как йодацетат (ингибирует гликолиз), азид и 2,4-динитрофенол (ускоряют утечку протонов через мембрану), а также анаэробные условия снижают или исключают потребление аминокислот.

В некоторых случаях ионная сила среды влияет на потребление аминокислот. Так, у *P. chrysogenum* возрастание концентрации NaCl приводит к снижению потребления C^{14}-лизина, но не влияет на потребление L-метионина.

Концентрация свободных аминокислот внутри клетки может ингибировать транспорт новых аминокислот из среды. Этот феномен называется трансингибированием и является механизмом, призванным предотвратить чрезмерное накопление питательных соединений. При этом влияние внутриклеточного пула аминокислот у *S. cerevisiae* неспецифично. Потребление зависит в первую очередь от величины пула, а не от типа присутствующих аминокислот. Предполагается наличие у каждой отдельной транспортирующей аминокислоту системы общей компоненты, чувствительной к трансингибированию.

С другой стороны, у некоторых грибов степень трансингибирования варьирует в зависимости от специфичности аминокислот. Так, у *Neurospora crassa* и *Penicillium chrysogenum* аминокислоты, имеющие высокую специфичность для L-метионин-переносящего белка, оказывают сильное трансингибирование потреблению L-метионина, те, у которых слабое сродство, демонстрируют слабое трансингибирование, а у которых нет сродства, нет и трансингибирования.

Разнообразие транспортных систем, участвующих в потреблении аминокислот, указывает на точность, с которой регулируется использование этих источников азота. В бедной

азотом среде обычно оперирует общая система потребления, приводя к использованию практически любой доступной аминокислоты. Когда окружающая среда питательно богата, у грибов появляется выбор и включаются индивидуальные транспортные системы.

Кроме аминокислот, грибы могут использовать для роста и другие органические источники азота, включая белки и пептиды, амиды, D-аминокислоты, пурины и пиримидины, имидазолы, амины и тиомочевину.

Способность использовать белки и пептиды зависит от секреции протеаз, которые гидролизуют макромолекулы. Образующиеся небольшие пептиды могут расщепляться до аминокислот либо секретируемыми экзопептидазами, либо пептидазами, ковалентно связанными с клеточной стенкой. Кроме того, некоторые грибы обладают транспортными системами для потребления короткоцепочечных пептидов. Так, найдены штаммы *S. cerevisiae* и *Candida albicans*, транспортирующие ряд ди- и трипептидов, которые в дальнейшем расщепляются внутриклеточными пептидазами.

Пурины и пиримидины могут использоваться в качестве источника азота *A. nidulans*, *N. crassa*, *P. chrysogenum* и большим количеством дрожжей. Конечный продукт деградации пуринов, пиримидинов и их производных — аммоний, который легко может быть использован для роста. Известны определенные транспортные системы для пуринов и пиримидинов.

Большинство исследованных линий дрожжей хорошо растут как на L-аминокислотах, так и на соответствующих D-аминокислотах, хотя для *A. nidulans* и *N. crassa* D-аминокислоты — крайне слабый источник азота. Возможность использования D-аминокислот определяется присутствием оксидазы D-аминокислот, катализирующей окислительное дезаминирование D-аминокислот.

10.5.3. Мочевина

Мочевина $(NH_2)_2CO$ — весьма распространенный продукт обмена веществ у животных, у которых она является конечным продуктом распада белков и выделяется из организма во внешнюю среду, так как не может быть использована далее в процессе метаболизма. У грибов мочевина и аммиак являются продуктами распада белков и аминокислот (аргинина). Мочевина может образовываться у грибов и в результате распада нуклеиновых кислот. Однако в отличие от животных, у грибов мочевина не выделяется во внешнюю среду, а накапливается в тканях грибов особенно в период созревания плодовых тел. Например, плодовое тело дождевика содержит до 10% мочевины, у шампиньона мочевины накапливается еще больше. Мочевина в плодовых телах грибов выполняет роль резервного источника азота, который используется для синтеза белка, клеточной стенки и других азот-содержащих компонентов, необходимых для формирования плодового тела.

Мочевина широко метаболизируется мицелиальными грибами и дрожжами, как источник азота. В результате гидролиза мочевины, в конечном счете, образуются аммиак и углекислый газ.

Литература

Беккер З.Э. 1988. Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Московского университета. 230 с.

Мюллер Э., Леффлер В. 1995. Микология. М.: Мир. 344 с.

Aisaka K., Masuda I. 1995. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea* // FEMS Microbiol.Lett. Vol.131. P.47–51.

Arlia-CiommoA., Leonov A., Piano A., Svistkova V., Titorenko V.I. 2014. Cell-autonomous mechanisms of chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Review // Microbial Cell. Vol.1. No.6. P.163–178.

Asakura M., Okuno T., Takano Y. 2006. Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium* // Appl Environ Microbiol. Vol.72. P.6345–6354.

Blumenthal H.J. 1963. Endogenous metabolism of filamentous fungi // Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.102. No3. P.688–706.

Blumenthal H.J. 1965. [Glycolysis] // G.C. Ainsworth, A.S. Sussman. The Fungi. Academic Press. N. Y. P.229–268.

Camp H.J.M. 1999. Trehalose phosphorylase activity and carbohydrate levels during axenic fruiting in three *Agaricus bisporus* strains // Curr. Microbiol. Vol.39. P.205–210.

Cornell Ö.J., Alam I., Soanes D.M., Wong H.M., Hedeler C., Paton N.W., Rattray M., Hubbard S.J., Talbot N.J., Oliver S.G. 2007. Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the fungi // Genome Research. Vol.17. P.1809–1822.

Czabany T., Athenstaedt K., Daum G. 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1771. P.299–309.

Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R. 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. Vol.14. P.1471–1510.

David H., Akesson M., Nielsen J. 2003. Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger* // Eur. J. Biochem. Vol.270. P.4243–4253.

Davis M.A., Wong K.H. 2010. [Nitrogen metabolism in filamentous fungi. 23] // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi.,Washington. DC: ASM Press. P.325–338.

Deacon J.W. 2005. Fungal biology. USA: Wiley-Blackwell. 384 p.

Dijkema C., Kester H.C.M., Visser J. 1985. 13C NMR studies of carbon metabolism in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans* // Biochemistry. Vol.82. P.14–18.

Doehlemann G., Berndt P., Hahn M. 2006. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea* // Microbiology. Vol.152. P.2625–2634.

Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation // Biochem. J. Vol.320. P.345–357.

Flores C.L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in nonconventional yeasts // FEMS Microbiol Rev. Vol.24. P.507–529.

Fredlund E. 2004. [Central carbon metabolism of the biocontrol yeast *Pichia anomala* — influence of oxygen limitation]. [Doctor's dissertation]. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Uppsala. 54 p.

Gancedo C., Serrano R. 1989. [Energy-yielding metabolism] // A.H. Rose, J.S.Harrison (eds.). Yeast. 2ndedn. Vol.3. P.206–259.

Griffin D.H. 1996. Fungal Physiology. USA: John Wiley & Sons. 472 p.

Hammond J.B.W., Nichols R. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach: changes in soluble carbohydrate during growth of mycelium and sporophore // Journal of General microbiology. Vol.93. P.309–320.

Hammond J.B.W., Wood D.A. 1985. [Metabolism, biochemistry and physiology] // P.B. Fleg, D.M. Spencer, D.A.Wood (eds.). The biology and biotechnology of cultivated mushroom. Chichester: John Wiley and Sons. P.63–80.

Hiltunen J.K., Mursula A.M., Rottensteiner H., Wierenga R.K., Kastaniotis A.J., Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal β-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiology Reviews. Vol.27. P.35–64.

Hult K., Gatenbeck S. 1978. Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternate* // Eur. J. Biochem. Vol.88. P.607–612.

Hynes M.J. 2010. [Gluconeogenesis] // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington. DC: ASM Press. P.312–324.

Hynes M.J., Murray S.L., Duncan A., Khew G.S., Davis M.A. 2006. Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // Eukaryotic Cell. Vol.5. P.794–805.

Hynes M.J., Murray S.L., Khew G.S., Davis M.A. 2008. Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans* // Genetics. Vol.178. P.1355–1369.
Idnurm A., Howlett B.J. 2002. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*) // Eukaryot Cell. Vol.1. P.719–724.
Jenni S., Leibundgut M., Boehringer D., Frick C., Mikolasek B., Ban N. 2007. Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling // Science. Vol.316. P.254–261.
Jennings D.H. 2008. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press. 622 p.
Kalberer P.P. 1990. Influence of water potential of the casing soil on crop yield and on dry-matter content, osmotic potential and mannitol content of the fruit bodies of *Agaricus bisporus* // J. Hort. Sci. Vol.65. P.573–581.
Katz M.E., Kelly J.M. 2010. Glucose // K.A. Borkovich, D.J. Ebbole (eds.). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington. DC: ASM Press. P.290–299.
Keller N.P., Hohn T.M. 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. Review // Fungal Genetics and Biology. Vol.21. P.17–29.
Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis // EMBO reports. Vol.2. P.282–286.
Kitamoto Y., Gruen H.E. 1976. Distribution of cellular carbohydrates during development of the mycelium and fruitbodies of *Flammulina velutipes* // Plant Physiology. Vol.58. P.485–491.
Kornberg H.L., Madsen N.B. 1957. Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acid cycle // Biochim. Biophys. Acta. Vol.24. P.651–653.
Kunze M., Pracharoenwattana I., Smith S.M., Hartig A. 2006. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function // Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res. Vol.1763. P.1441–1452.
Kurihara T., Ueda M., Okada H., Kamasawa N., Naito N., Osumi M., Tanaka A. 1992. Beta-oxidation of butyrate, the short chain length fatty acid, occurs in peroxisomes in the yeast *Candida tropicalis* // J. Biochem. Vol.111. P.783–787.
Lorenz M.C., FinkG.R. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence // Nature. Vol.412. P.83–86.
Maggio-Hall L.A., Keller N.P. 2004. Mitochondrial β-oxidation in *Aspergillus nidulans* // Molecular Microbiology. Vol.54. P.1173–1185.
Maggio-Hall L.A., Lyne P., Wolff J.A., Keller N.P. 2008. A single acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans* // Fungal Genetics and Biology. Vol.45. P.180–189.
Mansure J.J., Souza R.C., Panek A.D. 1997. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation // Biotechnol. Lett. Vol.19. P.1201–1203.
Moore D. 1998. Fungal Morphogenesis. N. Y.: Cambridge Univ. Press. 469 p.
Morton N., Dickerson A.G., Hammond J.B.W. 1985. Mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*: purification and properties of mannitol dehydrogenase // J. Gen. Microbiol. Vol.131. P.2885–2890.
Piekarska K., Mol E., Van den Berg M., Hardy G., van den Burg J., Van Roermund C., MacCallum D., Odds F., Distel B. 2006. Peroxisomal fatty acid β-oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans* // Eukaryotic Cell. Vol.5. P.1847–1856.
Piekarska K., Hardy G., Mol E., van den Burg J., Strijbis K., van Roermund C., van den Berg M., Distel B. 2008. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional β-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane // Microbiology. Vol.154. P.3061–3072.
Ramstedt M., Jirjis R., Soderhall K. 1987. Metabolism of mannitol in mycorrhizal and nonmycorrhizal fungi // New Phytologist. Vol.105. P.281–288.
Regev-Rudzki N., Karniely S., Ben-Haim N.N., Pines O. 2005. Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing // Mol. Biol. Cell. Vol.16. P.4163–4171.
Reich M., Göbel C., Kohler A., Buée M., Martin F., Feussner I., Polle A. 2009. Fatty acid metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* // New Phytologist. Vol.182. P.950–964.

Schweizer E., Hofmann J. 2004. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems // Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol.68. P.501–517.

Smith J.J., Brown T.W., Eitzen G.A., Rachubinski R.A. 2000. Regulation of peroxisome size and number by fatty acid β-oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica* // J. Biol. Chem. Vol.275. P.20168–20178.

Sorger D, Daum G. 2003. Triacylglycerol biosynthesis in yeast // Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.61. No.4. P.289–299.

Soto T., Fernandez J., Vicente-Soler J., Cansado J., Gacto M. 1999. Accumulation of trehalose by overexpression of tps1, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Appl. Environ. Microbiol. Vol.65. No.5. P.2020–2024.

Stoop J.M.H., Mooibroek H. 1998. Cloning and characterization of NADPH-dependent mannitol dehydrogenase from the button mushroom *Agaricus bisporus* and its expression in response to NaCl stress // Appl. Environ. Microbiol. Vol.64. P.4689–4696.

Sul H.S., Wang D. 1998. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription // Annual Review of Nutrition. Vol.18. P.331–351.

Thiam A.R., Farese R.V., Jr., Walther T.C. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol.14. P.775–786.

Trépanier M., Bécard G., Moutoglis P., Willemot C., Gagné S., Tyler A.S., Rioux J.A. 2005. Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis // Applied and Environmental Microbiology. Vol.71. P.5341–5347.

Tuckwell D., Denning D.W., Bowyer P. 2011. A public resource for metabolic pathway mapping of *Aspergillus fumigatus* Af293 // Medical Mycology. Vol.49. Suppl.1. P.S114–S119.

Vereecke D., Cornelis K., Temmerman W., Holsters M., Goethals K. 2002. Versatile persistence pathways for pathogens of animals and plants // Trends Microbiol. Vol.10. P.485–488.

Vogels G.D. 1998. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus* // Biochim et Biophys Acta. Vol.1425. P.177–188.

Wanders R.J., Vreken P., Ferdinandusse S., Jansen G.A., Waterham H.R., van Roermund C.W., Grunsven V. 2001. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases // Biochemical Society Transactions. Vol.29. P.250–267.

Wang Z.Y., Thornton C.R., Kershaw M.J., Debao L., Talbot N.J. 2003. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* // Mol. Microbiol. Vol.47. P.1601–1612.

Wang Z.Y., Soanes D.M., Kershaw M.J., Talbot N.J. 2007. Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid beta-oxidation during appressorium-mediated plant infection // Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol.20. P.475–491.

Wells T.K., Hammond J.B.W., Dickerson A.G. 1987. Variations in activities of glycogen phosphorylase and trehalase during the periodic fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. // New Phytologist. Vol.105. P.273–280.

Xu J., Saunders C.W., Hu P., Grant R.A., Boekhout T., Kuramae E.E., Kronstad J.W., DeAngelis Y.M., Reeder N.L., Johnstone K.R. *et al.* 2007. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.104. P.18730–18735.

Глава 11.
Старение и апоптоз[1]

11.1. Старение грибов (хронологическое и репликативное)

Большинство грибов, размножающихся клонально, как одноклеточных, так и мицелиальных, вероятно, бессмертны. Они бесконечно размножаются путем деления клетки и за счет роста апикальной клетки. При этом время жизни одной клетки у дрожжей коррелирует с временем клеточного цикла. Средняя продолжительность жизни клетки лабораторных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* зависит от способности к делению и времени клеточного цикла. Клетка дрожжей способна совершить в среднем 25 делений (время митоза 10–15 мин), а время клеточного цикла составляет примерно 135 минут (около 2 ч). Соответственно время жизни одной клетки почкующихся дрожжей составляет примерно двое суток.

Среди мицелиальных грибов имеются индивидуумы, например, опенок *Armillaria bulbosa,* который занимает до 15 га леса, весит порядка 10000 кг и при этом генетически стабилен на протяжении 1500 лет. В противоположность этому примеру другой мицелиальный аскомицет *Podospora anserina* развивается в лабораторных условиях на определенной среде роста 25 суток, а далее отмирает. Этот феномен старения мицелия *P. anserina* был назван senescence (одряхление) и активно исследуется, начиная с 50-х годов прошлого века.

Старение применительно к высшим эукариотическим организмам — процесс прогрессивного снижения способности противостоять стрессу, опасности и болезням. У грибов различают два типа старения: хронологическое и репликативное.

Хронологическим старением было названо явление потери жизнеспособности индивидуальных клеток дрожжей *S. cerevisiae* при культивировании в стационарной фазе роста.

---

[1] Сокращения

АФК — активные формы кислорода.

ЗГК — запрограммированная гибель клеток

МАР — киназный путь сигнальной трансдукции

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия.

ЭКФ — экстрахромосомные кольцевые фрагменты

AIF (англ. apoptosis inducing factor) — фактор индукции апоптоза

AmB — амфотерицин В

Apafl (apoptotic peptidase activating factor 1) — активирующий фактор апоптотической пептидазы 1

Bcl-2 — семейство белков, которые регулируют апоптоз на уровне митохондрий: предотвращающие апоптоз представители этого большого семейства включают собственно **Bcl-2**, а также **BclX$_L$** и некоторые другие; ускоряющие наступление апоптоза -проапоптозные белки — **Bax, Bad, BID** и некоторые другие.

BIR (Baculovirus IAP Repeat) — бакуловирусный IAP повтор

IAP (inhibitor of apoptosis proteins) — белки-ингибиторы апоптоза

HtrA2 — митохондриальная сериновая протеиназа, вносит вклад в каспаза-независимый путь апоптоза.

PARP — поли-ADP-рибозополимераза играет важную роль в поддержании целостности генома в случае опасности (апоптоз, некроз).

Smac или **SMAC** (second mitochondria-derived activator of caspases) — вторичные активаторы каспаз, образующиеся митохондриями.

TNF (англ. tumor necrosis factor) — фактор некроза опухоли

TUNEL (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) — метод определения фрагментации ДНК посредством мечения разрывов с использованием дезоксинуклеотидтрансферазы.

Сюда же могут быть отнесены случаи, известные многим микологам, утраты жизнеспособности мицелия грибов при длительном нахождении в культуре.

Репликативное или митотическое старение характеризуется ограниченным количеством клеточных делений при экспоненциальном росте колонии, сопровождающимся остановкой роста, прекращением деления и смертью либо старых клеток у дрожжей *S. cerevisiae*, либо апикальных у мицелиальных грибов (*P. anserina*).

11.1.1. Репликативное старение *Saccharomyces cerevisiae*

У дрожжей *S. cerevisiae* наблюдается асимметричное почкование клеток. Материнская клетка в течение жизни отпочковывает до нескольких десятков дочерних клеток, которые уступают по размеру материнской. Сама материнская клетка постепенно увеличивается в размере. Однако после определенного количества делений (в среднем 25) у материнской клетки падает скорость репродукции, она становится стерильной. И, что важно, происходит частичная потеря асимметрии деления — дочерние клетки увеличиваются в размере и заметно «наследуют старость» родительской клетки (но «внучки» — нет, рис. 118). Кроме этого, признаками старения являются: потеря пола у гаплоидных клеток, фрагментация ядрышка, остановка в синтезе ДНК и др. Все эти изменения происходят, благодаря изменению экспрессии генов. У *S. cerevisiae* выделены и охарактеризованы восемь генов, которые связаны с процессом старения клеток. Общими признаками старения для клеток дрожжей и клеток животных являются изменения митотического цикла (остановка синтеза ДНК, структурные изменения в ядрышке) и, в конечном итоге, остановка клеточного цикла, клетка не вступает в стадию митоза.

Было предположено, что при почковании между материнской и дочерней клетками распределяется некий фактор старения, который накапливается в клетке с возрастом (рис. 118А). Причем, как и само деление, распределенис фактора асимметричное. Существуют «фильтры», препятствующие проникновению негативного фактора в дочерние клетки. Однако данный фактор с каждым почкованием накапливается в материнской клетке, и после преодоления некоторого порога его концентрации «фильтры» не выдерживают.

Установлено, что в репликативно стареющих дрожжевых клетках таким фактором старения могут быть активно амплифицирующиеся ЭКФ (экстрахромосомные кольцевые

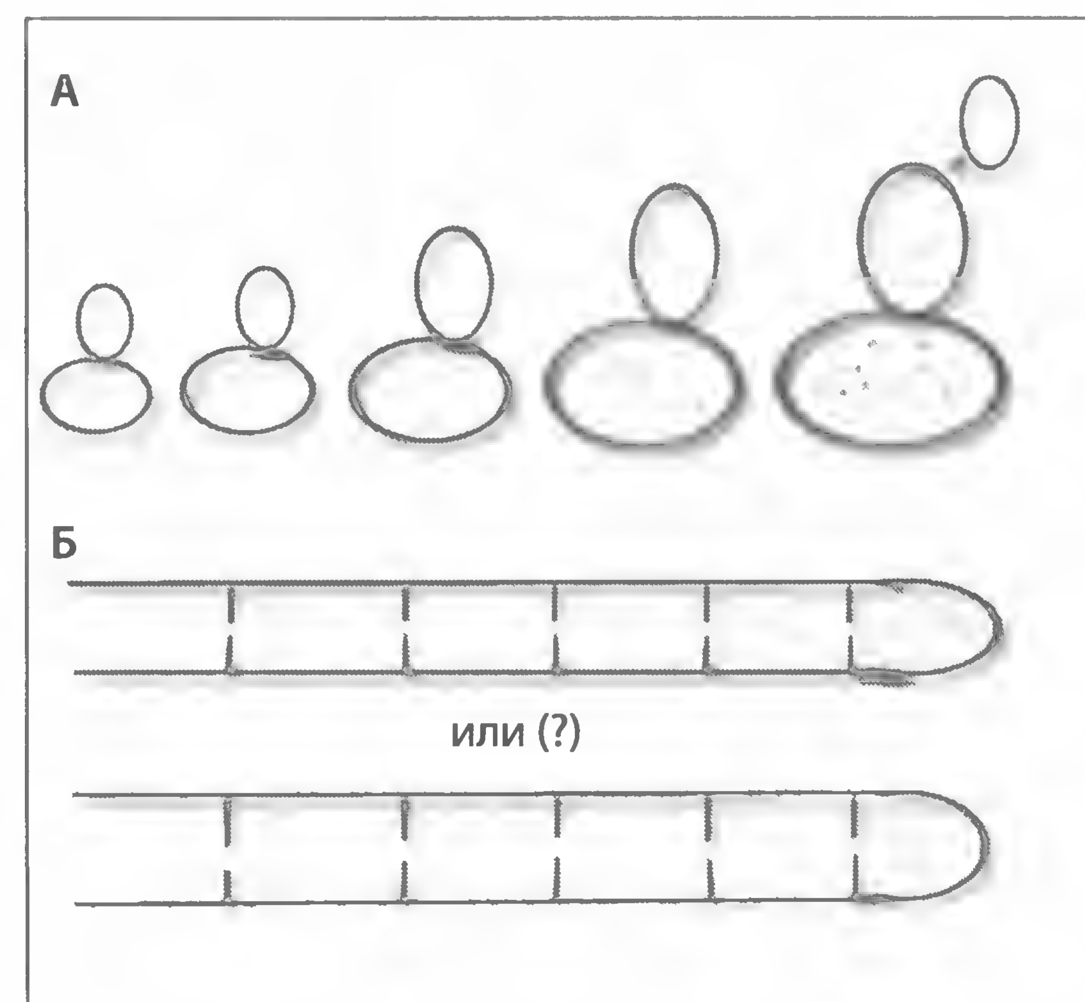


Рис. 118. Модельная схема накопления и распределения между клеток условного фактора старения. А — у почкующихся дрожжей. Б — у *Podospora anserina*. У дрожжей условный фактор старения (точки) долгое время не передается дочерним клеткам и накапливается только в материнской (фильтрация). У *P. anserina* фактор накапливается в гифальном апексе. Изображено два варианта такого накопления. Гифа сверху — без фильтрации, фактор накапливается в апексе — в месте наибольшей клеточной активности, и с равномерным возрастанием распределен от старых клеток к молодым. Гифа снизу — механизм, похожий на дрожжевой, с фильтрацией — фактор появляется в более старых клетках лишь тогда, когда его концентрация в апексе сильно возрастает и происходит «пробой» фильтров (Мажейка и др., 2011).

фрагменты ДНК). Они постепенно накапливаются в цитоплазме материнской клетке, но «отфильтровываются» при делении клетки. И лишь в достаточно старой материнской клетке эти фрагменты начинают наследоваться дочерними клетками.

11.1.2. Репликативное старение *Podospora anserina*

Аскомицет *P. anserina* на протяжении 50 лет является для генетиков и молекулярных биологов объектом пристального изучения вопросов, связанных со старением клеток мицелия. Синдром старения мицелия *P. anserina* (senescence) проявляется в виде остановки роста мицелия, полученного из проросшей аскоспоры при культивировании на определенной среде в среднем в течение 25 суток. После определенного этапа культивирования скорость роста апикальных гиф мицелия падает, меняется их морфология: изменяется ветвление, уменьшается доля воздушных гиф, накапливаются меланины, апикальные клетки вздуваются и даже лопаются. Старый мицелий становится стерильным и, в конце концов, погибает (рис. 119).

Состояние старения у *P. anserina* по некоторым данным вызвано увеличением концентрации фактора старения или детерминанты старения по всей длине гифы, начиная от более старых клеток к молодым, апикальным (рис. 118Б).

Кроме того, показано, что старение всегда ассоциировано с реорганизацией митохондриального генома: амплификацией экстрахромосомальной митохондриальной ДНК и модификацией митохондриальной ДНК. Корелляция между модификациями митохондрий и старением хорошо изучена, но все еще не понятно, являются ли эти модификации причиной старения мицелия. У *P. anserina* встречается до шести модифицированных фрагментов митохондриальной ДНК или senDNA (sen сокр. senescence) (α, β, γ, δ, ε, ζ), но только фрагмент αsenDNA обнаружен у большинства стареющих штаммов. Он стабилен по размеру (~ 2,6 kb) и по происхождению — исходно является первым интроном митохондриального гена *COX*1 (первая субъединица комплекса IV дыхательной цепи, цитохром с оксидазы (Cox).

Вследствие активных процессов рекомбинации во время старения культуры *P. anserina* мтДНК в значительной степени трансформируется. В результате гены, кодирующие белки дыхательной цепи, оказываются поврежденными, что вызывает блокирование дыхательной цепи. В растущих кончиках гиф стареющих культур восстановление поврежденных митохондрий, а также биогенез новых органелл оказываются замедлены. Как следствие, кончики гиф не могут расти из-за нехватки энергетических ресурсов, что и приводит к проявлению синдрома старения в этой части мицелия.

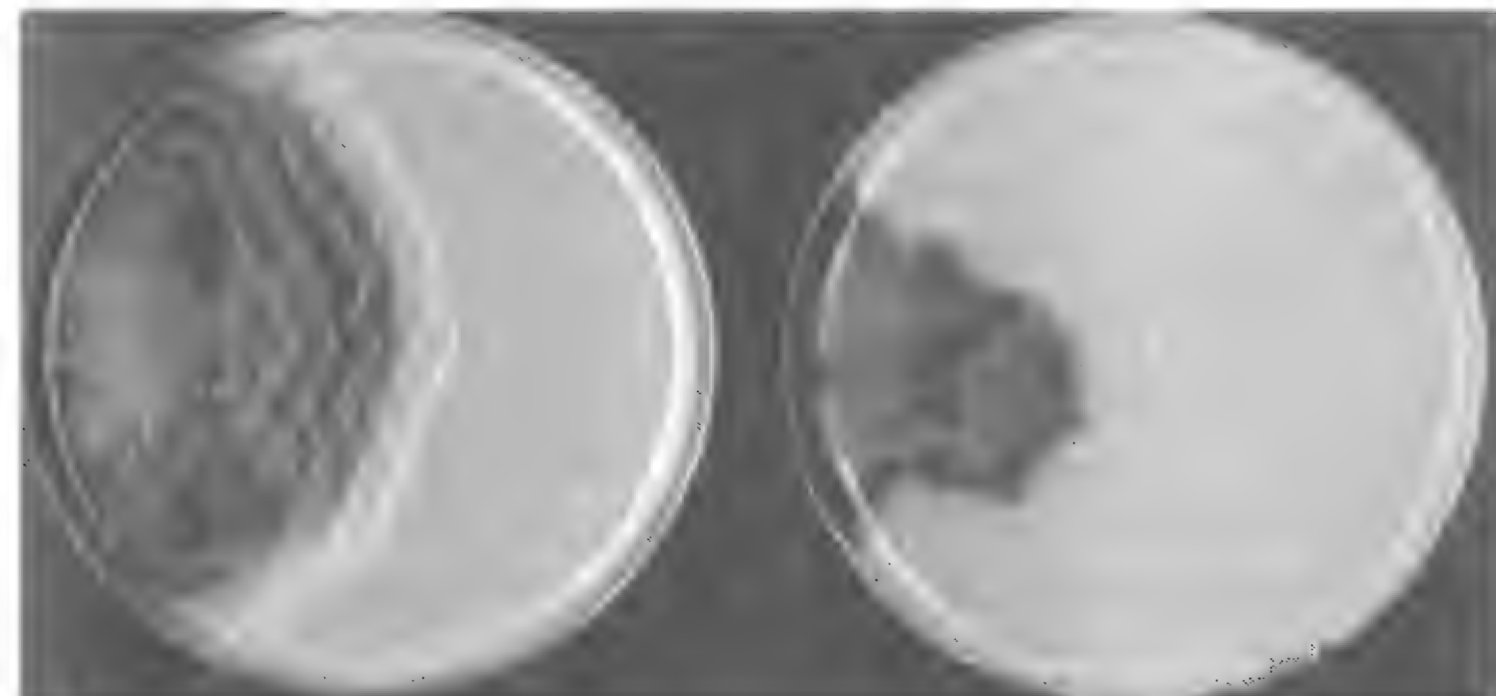


Рис. 119. Колонии *Podospora anserina* на агаризованной среде. Слева молодая, активно растущая колония, справа — «старая», остановившаяся в росте колония. www1.uni-frankfurt.de/fb/fb15/english/institute/inst-3-mol-biowiss/AK-Osiewacz/publications/index.html

11.1.3. Распространение и значение репликативного старения у грибов

Четко выраженное репликативное старение не имеет масштабного распространения среди грибов. Его обнаружили у некоторых видов *Podospora*, у ряда видов и штаммов *Neurospora*, *Aspergillus*, *Monilia*, миксомицета *Physarum polycephalum* и прочих. Ограниченный вегетативный рост мы наблюдали у штаммов видов базидиальных грибов из рода *Agaricus*: штаммы *A. bisporus*, *A. abruptibulbus*, *A. bitorques*, *A. silvaticus*.

По фенотипическому проявлению митотическое старение у дрожжей и *P. anserina* — онтогенетическая программа. Репликативное старение основано на слабо-запрограммированных процессах накопления факторов старения, но при этом обусловлено уже запрограммированным нарушением в контроле скорости накопления и распределения этих факторов.

В любом случае митотическое старение у дрожжей *S. cerevisiae* и *P. anserina* имеет популяционное и приспособительное значение. В природе *P. anserina* замыкает сукцессию грибов на помете травоядных и имеет вторичный гомоталличный жизненный цикл, который нередко характерен для сумчатых и базидиальных грибов копро-компостной эколого-трофической группы (рис. 120) В основе вторичного гомоталлизма или псевдогомоталлизма лежит образование преимущественно двухядерных, а не одноядерных мейоспор. Вторичный гомоталлизм — один из вариантов грибных систем размножения с выраженной тенденцией к клональности популяции. Подобный жизненный цикл прекрасно реализуется в условиях, когда необходимо быстрое размножение и не требуется большая генетическая изменчивость.

Можно предположить, что репликативное старение у дрожжей *S. cerevisiae* имеет несколько иное популяционное значение. Старение у данного гриба — механизм удаления

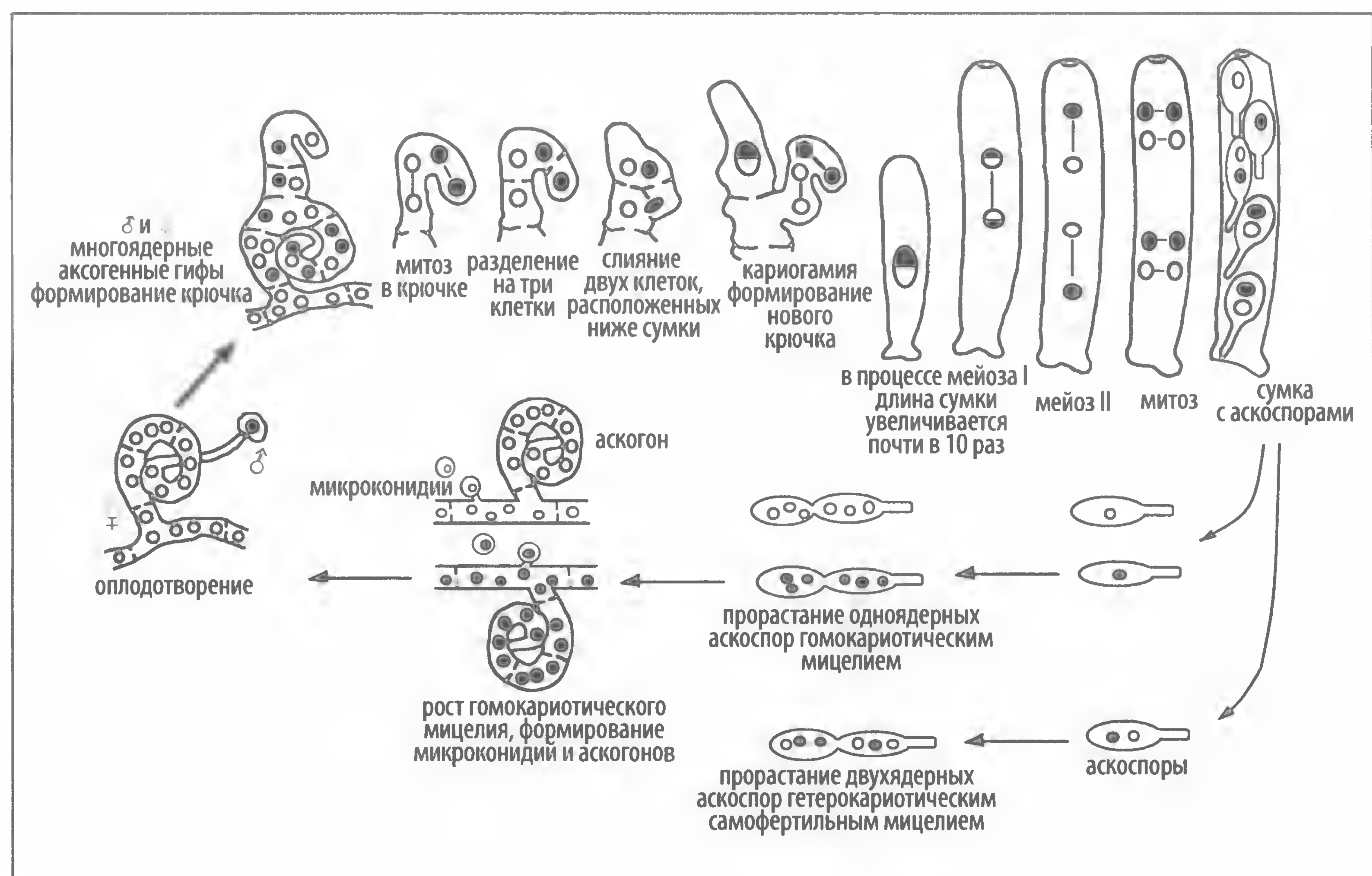


Рис. 120. Вторичный гомоталлизм и гетероталличность в жизненном цикле *Podospora anserina* (мод по Coppin et al., 1997).

старых клеток из колонии. Благодаря вышеупомянутым «фильтрам», материнская клетка забирает «плохое» в себя, обеспечивая здоровье дочерним клеткам.

11.2. Запрограммированная гибель клеток (ЗГК)

Судьба многих клеток или тканей у многоклеточных организмов (животных, растений) генетически предопределена или запрограммирована, что является обязательным условием онтогенеза. Например, гибель клеток и тканей при эмбриогенезе и морфогенезе животных (дегенерация мышечных тканей, метаморфоз насекомых и др.) или опадание листьев у растений. Запрограммированная гибель может происходить на уровне клеток (гибель митохондрий — митоптоз), тканей, органов (органоптоз), организма (феноптоз, гибель особей лосося после выметывания икры).

До 90-х годов прошлого века не предполагали о существовании запрограммированной клеточной гибели у грибов. Однако накопившиеся наблюдения за развитием и гибелью клеток грибов показали ее присутствие. Так, например, ЗГК наблюдается у грибов в процессе развития спор полового и бесполого размножения, при формировании плодового тела или склероция, в реакции вегетативной несовместимости и патогенезе, в стрессовых условиях роста и завершает процесс старения.

Выделяют два типа генетически детерминированной гибели клеток: апоптоз и автофагия в отличие от некроза. Некроз также представляет собой процесс гибели клеток, но не относится к генетически детерминированной гибели.

11.2.1. Апоптоз у грибов

11.2.1.1. Черты апоптоза у Saccharomyces cerevisiae

Апоптоз (англ. apoptosis) представляет собой регулируемый процесс самоубийства на клеточном уровне, его относят к программируемой смерти клетки первого типа (ЗГК I). Исследования, проведенные в ранние 90-е годы, впервые показали, что у клеток дрожжей *S. cerevisiae* происходит апоптоз. В ряде случаев выявлены характерные признаки апоптоза: переход фосфатидилсерина из внутреннего в наружный слой цитоплазматической мембраны, фрагментация ДНК, конденсация хроматина, образование активных форм кислорода, выход цитохрома *с*. Достоверно найдены в дрожжах следующие апоптотические белки: метакаспаза, HtrA/Omi протеаза, AIF (apoptosis inducing factor), нуклеаза G (рис. 121). Получено свидетельство роли каскада MAP-киназ в апоптозе дрожжей и мицелиальных грибов.

Все это было неожиданностью, так как сложно себе представить значение этого события в жизни одноклеточных организмов. На сегодняшний день апоптоз у дрожжей детально описан. Апоптотическая смерть дрожжевых клеток происходит в различных условиях, и у *S. cerevisiae* идентифицированы и охарактеризованы гомологи апоптотических генов человека. Эти исследования также выявили фундаментальные различия между апоптозом животных и дрожжей. У грибов апоптоз связан со старением, адаптацией к стрессу, защитой от конкурентов и в некоторых случаях с онтогенезом, апоптоз животных важен прежде всего для правильного развития. Многие регуляторные гены апоптоза у грибов или отсутствуют, или претерпели дивергенцию. Поэтому ряд ученых используют термин апоптозоподобная смерть вместо апоптоза применительно к грибам.

У животных существуют два главных апоптотических пути: наружный путь, включающий так называемые рецепторы смерти, рецепторы семейства TNF (фактора некроза опухолей, tumor necrosis factor), и внутренний путь, завязанный на проницаемость наружной

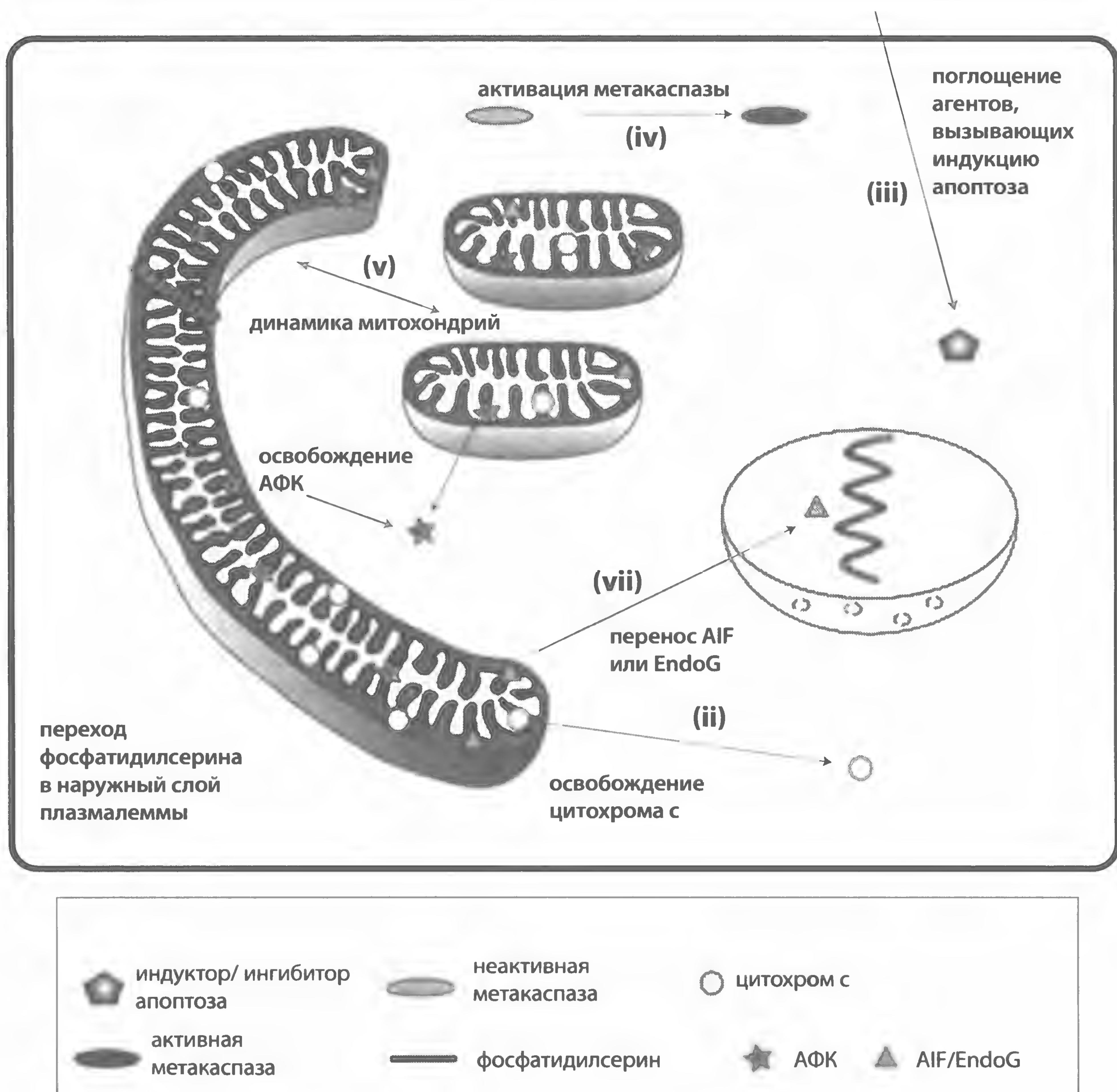


Рис. 121. Схематично даны процессы, участвующие в апоптозе грибов. Порядок этих процессов не отражает хронологическую последовательность: (i) переход фосфатидилсерина из внутреннего в наружный слой цитоплазматической мембраны, (ii) выход цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль, (iii) потребление агентов, вызывающих апоптоз, (iv) активация метакаспазы, (v) фрагментация митохондрий, (vi) освобождение активных форм кислорода из митохондрий, (vii) перенос апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) или эндонуклеазы G (EndoG) из митохондрий в ядро, фрагментация ДНК и конденсация хроматина (Hamann et al., 2008).

мембраны митохондрий. У млекопитающих наружный путь опосредован сигнальным комплексом (death-inducing signaling complex, DISC), который содержит триммер рецепторов смерти (death receptor trimer), FADD (Fas associated death domain) адапторные белки и каспазы 8 и 10. Внутренний путь начинается с освобождения цитохрома *c* из митохондрий (апоптотический стимул), который совместно с Apaf1 (apoptotic peptidase activating factor 1) и прокаспазой 9 формируют гептамерный комплекс, называемый апоптосомой. Главными регуляторами ЗГК I у животных являются про- и анти-апоптотические члены семейства белков Bcl-2, которые функционируют до или на уровне внешней мембраны митохондрий.

У дрожжей ЗГК типа I индуцируется разными триггерами и характеризуется основными, но далеко не всеми чертами апоптоза животных. Апоптотический аппарат дрожжей имеет ряд отличий от апоптотического аппарата животных. Весь внешний путь у дрожжей не обнаружен. Более того, важные регуляторы внутреннего пути, включая белки Bcl-2, p53, FLIP, поли-ADP-рибозополимеразу (PARP) и даже каспазы не имеют очевидных гомологов у *S. cerevisiae.* Любопытно, что гомологи некоторых регуляторных белков, отсутствующие у *S. cerevisiae,* присутствуют у мицелиальных грибов.

11.2.1.2. Старение и апоптоз у Podospora anserina

Процесс старения мицелия *P. anserina,* как отмечалось выше, характеризуется зависимым от возраста снижением скорости роста мицелия, снижением способности формировать воздушный мицелий, увеличением пигментообразования и в конце — гибелью периферических гиф (апоптозом).

Показано, что срок жизни клеток *P. anserina* определяется дыхательной активностью и, вероятно, содержанием активных форм кислорода (АФК). Многочисленные данные, полученные при изучении мутантов *P. anserina* с различными нарушениями дыхания, позволяют установить связь между эффективностью осуществления дыхания, уровнем генерации активных форм кислорода, стабильностью митохондриального генома и продолжительностью жизни.

Утрата функции цитохром *c* оксидазы значительно продлевает срок жизни у *P. anserina.* Отсутствие части дыхательной цепи не летально для клеток гриба, так как начинает функционировать боковая ветвь дыхательной цепи на уровне убихинон – альтернативная оксидаза. Функционирование альтернативного пути приводит к потере двух или трех сайтов соединения компонентов дыхательной цепи, что приводит к снижению эффективности синтеза АТФ. Причем конститутивная экспрессия альтернативного пути у долгоживущих дыхательных мутантов приводит к увеличению АФК, что коррелирует с уменьшением продолжительности жизни. Все эти исследования говорят о ключевой роли митохондрий в продолжительности жизни у *P. anserina*, однако они не отвечают на вопрос, какие критические параметры митохондрий контролируют ее. В отличие от *P. anserina*, у почкующихся дрожжей фактор старения ЭКФ не связан с митохондриями.

Сходно с другими организмами финальные стадии ЗГК I у грибов протекают при участии цистеиновых протеаз, проявляющих каспазную активность. У грибов обнаружены, по крайней мере, один или два гена, родственных генам каспаз. В то время как ферменты, кодируемые этими генами, узнают типичные субстраты каспаз, кодируемые ими белки показывают слабую гомологию с каспазами животных. Было предположено, что эти белки представляют собой каспазо-подобные протеазы и их стали называть метакаспазами. Каспазо-независмый путь апоптоза, который (как и у человека) вовлекает AIF и его гомологи, ассоциированные с митохондриями индукторы смерти, также присутствует у грибов.

Функциональный анализ метакаспазозависимых и независимых путей был проведен путем делеции генов метакаспаз или членов AIF у *P. anserina.* Делеция гена одной из двух метакспаз *PaMCA1* или *PaMCA2* у *P. anserina* снижала чувствительность к условиям, индуцирующим ЗГК, и увеличивала продолжительность жизни. AIF у *P. anserina* имеет, по крайней мере, пять членов, которые делятся на цитозольные и митохондриальные. Делеция митохондриальных *PaAIF2* или *PaAMID2* вызывала снижение чувствительности к окислительному стрессу и увеличивала продолжительность жизни, в отличие от делеции генов цитоплазмтических факторов *AIF*, *PaAIF1* или *PaAMID1.*

11.2.1.3. Апоптотическая сеть у грибов (рис. 122)

Апоптотические пути у грибов тесно связаны с митохондриями и могут быть метакаспазозависимыми или независимыми. Сходно с ситуацией с животными для апоптоза грибов характерно накопление АФК, хотя это не обязательно, так как апоптоз может инду-

цироваться стимулами, независимыми от АФК. Главные характеристики апоптоза грибов соответствуют внутреннему пути апоптоза животных. Образ жизни грибов отличается от млекопитающих. Апоптоз у последних эволюционировал, стал выполнять разнообразные функции в развитии организма и приобрел усовершенствованные способы регуляции. Таким образом, центральная апоптотическая машина у грибов сходна с высшими организмами, но другие компоненты аппарата апоптоза, по-видимому, различны. Действительно, поиск в доступных геномах грибов показал предполагаемых гомологов апоптотических генов у дрожжей и мицелиальных грибов. Идентифицированные гены являются гомологами ассоциированных с митохондриями регуляторов апоптоза, такими как секретируемые митохондриями белки цитохром *c* и Omi/HtrA2, метакаспазы и ингибиторы апоптоза (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) (рис. 122). Существенно, что каспазо-независимый путь, по-видимому, высоко консервативен у грибов и известные элементы этого пути идентифицированы в геномах дрожжей и мицелиальных грибов. Более 50 предполагаемых ассоциированных с ЗГК генов человека и мыши описаны у *Aspergillus*. Дополнительно к консервативной основе компонентов апоптотической машины животных, этот список включает много специфичных для грибов генов. Некоторые из этих белков, такие как Apaf1 (вовлечен в формирование апоптосомы) и PARP, не представлены у *S. cerevisiae,* но имеются у мицелиальных грибов. Подробное исследование предположительно апоптотических грибных генов показало, что во многих случаях они не имеют полной гомологии с генами животных. Гомология апоптотических белков между грибами и млекопитающими обычно ограничена специфичными доменами белков, но в остальном имеется высокая дивергенция последовательностей между генами грибов и их ортологами у млекопитающих.

Апоптотические белки млекопитающих могут содержать разные домены, тогда как только один единственный тип апоптотического домена присутствует у соответствующего грибного ортолога. Более того, в большинстве случаев, грибной домен сходен, но не идентичен домену, присутствующему у млекопитающих.

Например, каспазы человека синтезируются как неактивный зимоген, который состоит из N-концевого продомена, предшествующего большой субъединице порядка 20 кДа и маленькой субъединице около 10 кДа, соединенным линкерной областью. Различаются два типа каспаз: инициаторные каспазы, которые активируются автокаталитически в ответ на определенные апоптотические сигналы, и эффекторные каспазы, которые активируются инициаторными каспазами, инициирующими протеазный каскад. Инициаторные каспазы характеризуются длинным продоменом и содержанием CARD домена (caspase-recruitment domain, домен активации и рекрутирования каспазы) или DED домена (death-effector domain), которые нужны для взаимодействия с адапторными белками, опосредующими гетеродимеризацию этих каспаз, необходимую для активации фермента. Активация каспаз ведет к запуску протеолитического каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Каспазы специфически расщепляют белки после остатка аспарагиновой кислоты и имеют функциональный цистеин в активном участке.

Каспазы пока не идентифицированы у грибов. Вместо этого грибы (и растения) имеют класс родственных протеаз, называемых метакаспазами. Сравнение последовательностей каспаз и метакаспаз показало незначительное сходство. Метакаспазы не содержат домены CARD или DED, и гомология с каспазами ограничена активным сайтом. Более того имеется структурное различие и между активными сайтами метакаспаз и каспаз, которое предполагает возможные различия в субстратной специфичности.

Другой пример — белки ингибиторы апоптоза IAPs, которые защищают от апоптоза путем блокирования каспаз. Независимо от их происхождения структурно IAPs содержат от одного до трех повторяющихся BIR доменов (бакуловирусный IAP повтор, Baculovirus IAP Repeat, составленный из примерно 70 аминокислотных остатков), которые опосредуют взаимодействия с каспазами. IAP белки могут также содержать С-терминальнй RING-фингер домен с E3 убиквитин-лигазной активностью и CARD домен, который может взаи-

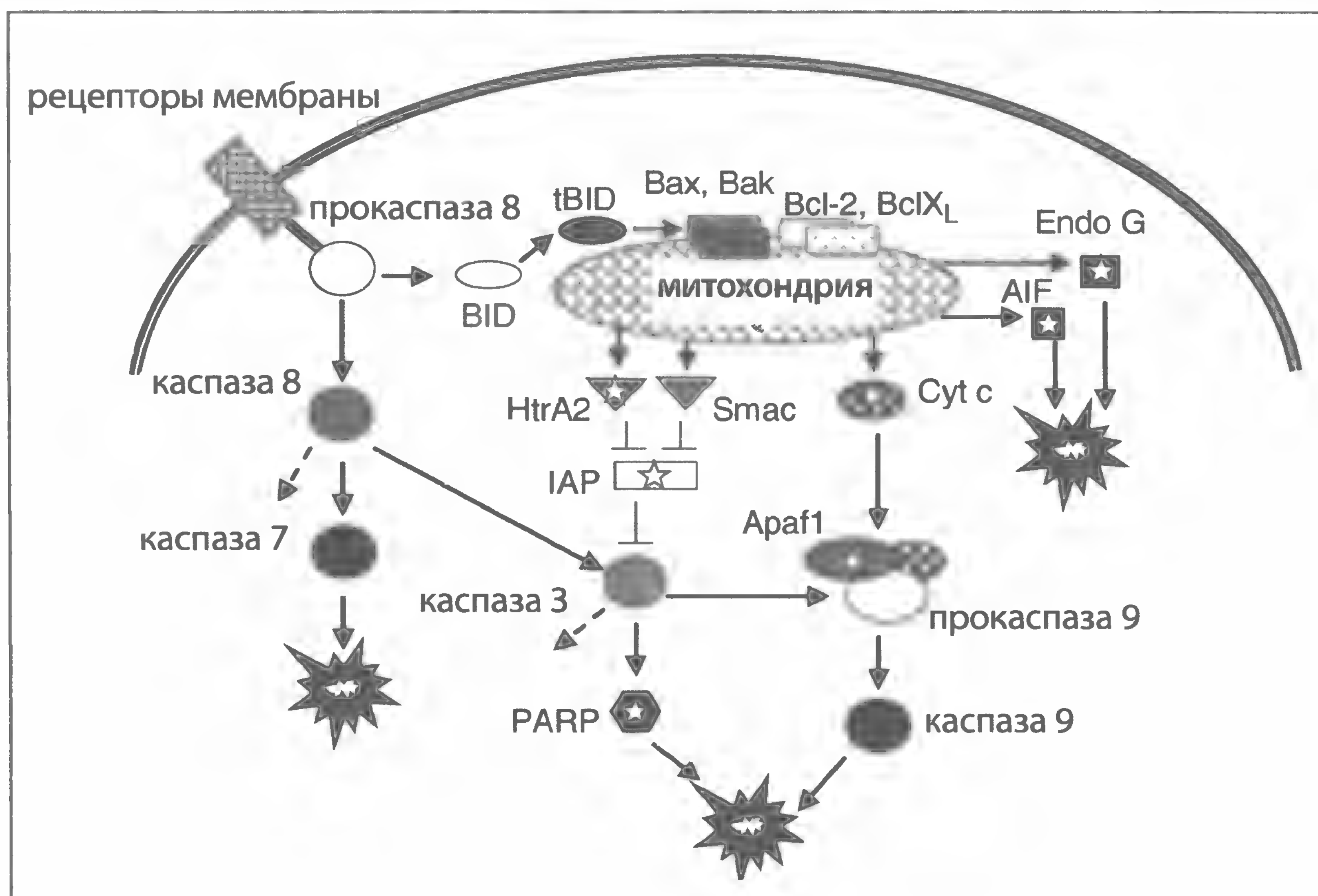


Рис. 122. Схема путей апоптоза у грибов и животных. Показаны только главные регуляторы. Найденные грибные гомологи белков помечены звездочкой. Не идентифицированы грибные гомологи белков, компонентов рецепторного пути смерти (обозначенного слева). Обнаруженный у грибов каспазо-независимый апоптоз происходит с участием активированной нуклеазы EndoG и апоптоз-индуцирующего фактора AIF (обозначены справа).

Наружный путь апоптоза животных начинается с рецепторов мембран и задействует ряд каспаз (каспазозависимый путь).

Внутренний путь апоптоза животных и грибов (каспазонезависимый путь, центральная роль принадлежит митохондриям): проапоптотический цитозольный белок BID после расщепления прокаспазой 8 превращается в активную форму tBID, tBID активирует путем частичного расщепления другой проапоптозный белок Bax Тот, взаимодействуя с митохондриальным белком порином, образует во внешней мембране канал, по которому выходят цитохром *c* (Cyt *c*) и AIF. AIF направляется прямо в ядро и вызывает деградацию ДНК (Sharon et al., 2009).

модействовать с инициаторными каспазами. У грибов обнаружены IAP-подобные белки. BIR домен этих IAP-подобных белков немного больше, чем у IAP белков млекопитающих, и поэтому назван BIR типа II. Грибные IAP-подобные белки обладают 1 или 2 доменами BIR, по сравнению с 3 доменами BIR у IAPs млекопитающих, не содержат никаких других доменов, обнаруженных у IAPs, за исключением гомологов домена BIR, и высоко вариабельны по размеру и структуре.

Эти два примера показывают, что компоненты грибной апоптотической сети могут структурно очень отличаться от своих ортологов млекопитающих, оставляя только базовые элементы, которые связаны с их апоптотической ролью. Приведенные примеры демонстрируют, что грибная апоптотическая сеть менее комплексна с меньшим числом взаимодействий и сниженной способностью к тонкой настройке своего ответа. Это подтверждается и на генном уровне. Регуляторы апоптоза млекопитающих часто являются членами крупных семейств белков. Хотя разные члены этих семейств белков могут показывать дублирование функций, в целом, они вовлечены в разные аспекты апоптоза и в ответ на разные сигналы. В отличие от этого, у большинства грибов присутствуют только 1 или 2 гена каспазо-подобных ферментов, связанных с апоптозом и родственных генам

млекопитающих. Например, у людей имеется 14 разных каспаз, которые делятся на инициаторные и эффекторные каспазы. Некоторые из них, такие как каспаза-8, специфичны к наружному пути с рецепторами смерти; другие, такие как каспаза-9, специфичны к митохондриальному внутреннему пути, а некоторые, такие как каспаза-3, общие для обоих путей. Сходно с этим, у человека имеется восемь членов семейства IAP. Хотя нет пока полной характеристики их действия, известно, что разные члены IAP взаимодействуют с разными каспазами. В отличие от этого, у *S. cerevisiae* имеется единственная метакаспаза (Yca1p) и один BIR-содержащий белок (Bir1p). У мицелиальных грибов обычно обнаруживаются две метакаспазы и один BIR-содержащий белок. Однако некоторые грибы вообще не содержат BIR-содержащих белков, вероятно, их функции могут выполнять другие белки. Некоторые важные регуляторы апоптоза полностью отсутствуют у грибов, в частности регуляторные компоненты, действующие в направлении 5′-нити ДНК, которые опосредуют апоптотические сигналы. Например, в геноме грибов не представлены белки семейства Bcl-2. Это важное семейство про- и анти-апоптотических белков включает у человека 25 членов. Хотя структурные гомологи Bcl-2 еще не идентифицированы в грибных геномах, часть их функций могут выполнять негомологичные грибные белки. Это может распространяться и на другие элементы сети апоптоза, например, на регулятор апоптоза p53 или митохондриальный белок SMAC/Diablo. Нельзя исключить и существование у грибов апоптотического пути, который улавливает сигналы наружного пути и включает рецепторы смерти вместе с компонентами, работающими в направлении 3′-конца ДНК, несмотря на отсутствие узнаваемых компонентов этого пути.

В заключение необходимо отметить, что основная апоптотическая сеть у грибов содержит белки, которые имеют основные регуляторные домены, обнаруженные в соответствующих апоптотических белках млекопитающих (рис. 122). Домены, обнаруженные в грибных генах, не всегда идентичны таковым у ортологов млекопитающих и, вероятно, представляют собой более древнюю форму апототических доменов. В общем грибная апоптотическая сеть, по-видимому, менее комплексная, чем у животных, и некоторые известные апоптотические белки отсутствуют у грибов. Эти белки или не важны для грибного апоптоза, или их функции могут выполнять негомологичные белки, которые обеспечивают функционирование апоптотического пути вопреки отсутствию сходства последовательностей.

11.2.1.4. Роль апоптоза в развитии грибов

Вегетативная несовместимость.

У мицелиальных грибов слияние гиф — часто наблюдаемое явление. Может происходить слияние гиф как в пределах одной колонии, так и между разными штаммами, как часть парасексуального процесса. Слияние между гифами разных штаммов формирует гетерокарион, в котором клетки содержат генетически разные ядра. У грибов имеется специфичный локус несовместимости гетерокарионов (HI), который определяет совместимость слияния гиф. Гифы должны быть друг с другом вегетативно совместимы для поддержания гетерокариотичности. При несовместимости происходит быстрая активация генов HI, что приводит к специфическому убийству слившихся клеток. Во многих случаях HI отвечают за хорошо известную реакцию гиперчувствительности (HR) у растений, в процессе которой ограниченная апоптозоподобная смерть клетки препятствует распространению патогена. Как реакция несовместимости гетерокарионов, так и реакция гиперчувствительности сопровождаются участием классических маркеров апоптоза и широко исследуются. В процессе ответа генов HI, слившиеся гифы подвергаются серии ассоциированных с апоптозом морфологических изменений, включающих конденсацию цитоплазмы, вакуолизацию и сокращение цитоплазматической мембраны. Также наблюдается фрагментация ядра и положительное TUNEL окрашивание (тест на апоптоз). Распространение и высокая численность локусов HI у мицелиальных грибов указывает на их значимость.

Формирование спор

Апоптозоподобная клеточная смерть связана с формированием спор, половых и бесполых (конидий). У некоторых *гомоталличных видов* (с самооплодотворением) незрелые сумки содержат восемь аскоспор, но четыре отмирают в процессе созревания, приводя к формированию четырехспоровых сумок. Исследования *Coniochaete tetrasperma* показали, что ЗГК происходит в процессе созревания спор, удаляя четыре из восьми аскоспор. Цитологические маркеры апоптоза наблюдали у мейотических мутантов *Coprinopsis cinerea* (syn. *Coprinus cinereus*). У этих мутантов происходит арест мейоза после метафазы первого деления и базидия с базидиоспорами подвергается апоптозоподобной смерти. В отличие от *C. tetrasperma*, у которого происходит апоптоз в процессе нормального развития спор дикого типа, здесь этот процесс служит для элиминации мутантных спор. У *P. anserina* делеция двух генов метакаспазы вызывает дефекты формирования аскоспор. Гиперэкспрессия антиапоптотического гена Bcl-2 у трансгенного штамма *Colletotrichum gloeosporioides* вызывает резкое повышение продукции конидий. Эти два последних примера, хотя и косвенно, указывают на то, что изменения в регуляции апоптоза могут влиять на половое и бесполое спороношение. У *Aspergillus nidulans* апоптотические маркеры и индукция активности каспазоподобных протеаз наблюдаются в процессе споруляции. Каспазная активность была показана путем гидролиза субстратов, специфичных для каспазо-3- и 8-подобной активности. Эта активность репрессировалась каспазо-3- и -8-специфичными необратимыми ингибиторами, но не подавлялась неспецифическим ингибитором Е-64. Экстракт *A. nidulans* содержал два белка, у которых выявлена каспазо-подобная активность: один из них расщеплял каспазо-3- и -8-специфичные субстраты, а другой деградировал только субстрат каспазы-8. Кроме метакаспаз, у *A. nidulans* был идентифицирован один (PARP)-подобный белок. PARP-подобный белок был определен в мицелии до момента формирования конидий и затем деградировал с увеличением каспазной активности.

Эти примеры свидетельствуют об участии апоптоза в размножении грибов. Апоптоз может происходить при формировании мейо- и митоспор в процессе нормального развития и в случае отклонений, в которых апоптоз может служить контрольным механизмом для удаления генетически опасных спор. В этом случае апоптоз должен быть тесно связан с клеточным циклом.

11.2.1.5. Индукторы апоптоза у грибов

Имеется несколько свидетельств в пользу связи апоптоза со стрессовым ответом у грибов. Сходно со старением, стрессовый ответ обычно инициируется окислительным стрессом, что может привести либо к устойчивости к стрессу, либо к инициации апоптотической гибели.

Условия, индуцирующие апоптоз у грибов, включают разные типы стресса, такие как: УФ, окислительный стресс, обработка веществами широкого спектра действия (соли и кислоты) или специфическими веществами, включающими известные противогрибные средства. Пока индуцированный апоптоз описан у нескольких видов грибов, часть информации получена на дрожжах *S. cerevisiae*.

Индукция апоптоза в условиях окислительного стресса известна для нескольких грибов, включая *S. cerevisiae*, *Candida albicans* и *Aspergillus fumigatus*. Обработка клеток этих грибов перекисью водорода вызывала фрагментацию ДНК, что проявлялось с помощью TUNEL окрашивания и гель-электрофореза ДНК (*S. cerevisiae* и *A. fumigatus*). Окрашивание ДНК клеток *S. cerevisiae* показало конденсацию хроматина. Конденсация хроматина и деградация ядра были определены у *S. cerevisiae* и *C. albicans* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) после обработки перекисью водорода. Положительную реакцию с аннексином V (выявление апоптотических клеток) и отрицательную с PI (пропидиум иодид, выявление некротических клеток) наблюдали у *A. fumigatus* и *C.*

albicans. Предварительная обработка *S. cerevisiae* и *A. fumigatus* циклогексимидом блокировала H_2O_2-индуцированный апоптотический фенотип.

Выше определенного порога концентраций H_2O_2, количество апоптотических клеток снижалось параллельно с увеличением числа некротических клеток. При H_2O_2-индуцированной клеточной гибели у *A. fumigates* не наблюдали увеличение каспазной активности, и предварительная обработка ингибитором каспаз широкого спектра действия Z-VAD-FMK не влияла на количество TUNEL-положительных клеток. Таким образом, у *A. fumigatus* H_2O_2-индуцируемый апоптоз, вероятно, каспазо-независим.

УФ облучение индуцирует апоптоз у клеток млекопитающих и имеет сходный эффект на почкующиеся дрожжи. Облучение УФ *S. cerevisiae* приводит к клеточной смерти с признаками апоптоза. TUNEL-положительные клетки были определены после облучения УФ, и их число изменялось в зависимости от дозы с пиком 120 Дж/м^2. Более высокие дозы УФ приводят к потере жизнеспособности, число TUNEL-положительных клеток снижается, предполагая сдвиг от апоптоза в сторону увеличения некротических клеток. Проточная цитофлуориметрия выявила увеличение числа клеток, находящихся в поздней стадии апоптоза с фрагментированным содержимым ядра, что коррелирует с результатами TUNEL анализа. Исследование ультраструктуры УФ облученных клеток показало, что большая их часть содержит конденсированный хроматин и высоко вакуолизирована, и эта тенденция увеличивается со временем.

Стационарные культуры *A. fumigatus* демонстрируют апоптотические маркеры параллельно с увеличением каспазо-1 и -8-подобной активности, нарушением целостности мембран и снижением жизнеспособности клеток. Добавление специфического ингибитора синтеза белка циклогексимида или ингибитора каспаз Z-VAD-FMK к культурам до перехода в стационарную фазу блокировало апоптотическую смерть, что указывает на каспазо-зависимый процесс, требующий синтеза белка *de novo*. На клеточную смерть под действием физических факторов циклогексимид или Z-VAD-FMK не оказывают влияние, подтверждая индукцию апоптоза при входе в стационарную фазу роста.

У *S. cerevisiae* **гиперосмотический стресс,** вызванный высокой концентрацией глюкозы или сорбитола, связан с повышением каспазной активности. Чувствительность к гиперосмотическим условиям была снижена у штамма yca1Δ с делецией гена метакаспазы. Сходные эффекты наблюдали при высоких концентрациях соли (1.5M NaCl), что может быть обусловлено либо осмотическим стрессом, либо токсическим действием, индуцируемым солью. Повышение каспазной активности наблюдали у NaCl-обработанных клеток, а клетки штамма yca1Δ обладали пониженной чувствительностью к высоким концентрациям соли, что свидетельствует о каспазо-опосредованном ответе на NaCl.

Низкие концентрации **уксусной кислоты и других слабых кислот** могут также индуцировать апоптоз у грибов. Клетки дрожжей, инкубированные с вальпроевой кислотой низкой концентрации, показывают наличие разных апоптотических маркеров, включая фосфатидилсерин и накопление АФК. Ответ, по-видимому, каспазо-зависимый, так как клетки штамма yca1Δ менее чувствительны к обработке и показывают снижение в TUNEL окрашивании и в реакции с аннексином V. Мутантные клетки yca1Δ окрашиваются положительно с дигидроэтидиумом. Была показана индукция апоптоза у дрожжей **ионами Cu^{+2} и Mn^{+2}**. Ответ на ионы меди был зависимым от АФК, но независим от каспаз, в то время как ответ на ионы марганца не вовлекает АФК, но каспазо-зависим. Как можно видеть из этих примеров, большая часть индукторов апоптоза у *S. cerevisiae* вызывает каспазо-зависимую апоптотическую гибель клеток.

Специфические противогрибные компоненты

Многие компоненты с антигрибной активностью препятствуют определенным процессам, главным образом, нарушая целостность клеточной стенки и мембраны. Способ действия этих компонентов обусловлен их мишенью, которая во многих случаях связана с эргостеролом или его биосинтезом. Например, полиены убивают клетки грибов, образуя

поры в клеточной мембране, благодаря высокому сродству к эргостеролу грибов. Другие лекарства ингибируют процессы, которые важны для биосинтеза клеточной стенки. Так, эхинокандины ингибируют синтез ß-1,3-глюкана, который является основным компонентом клеточной стенки грибов. Признание апоптоза как жизненно важного процесса у грибов привело к переоценке способа действия главных антигрибных компонентов. Диапазон противогрибных препаратов включает и противогрибные белки.

Полиен **амфотерицин В** (AmB) используется для лечения грибных инфекций человека уже порядка 30 лет. Подобно другим полиеновым антибиотикам, AmB имеет высокое сродство к стеролам, особенно к эргостеролу. Считалось, что антигрибная активность AmB обусловлена взаимодействием с эргостеролом плазматической мембраны, вызывающим формирование пор и нарушающим целостность клетки. Однако недавно было показано, что AmB вызывает апоптозо-подобную смерть у грибов. Мицелий *Aspergillus fumigatus*, обработанный AmB, показывает дозо-зависимое TUNEL- и аннексин V-окрашивание. Причем, доза свыше 1 мкг/мл AmB вызывает смещение с апоптоза к некрозу, что определяется увеличением PI-положительных клеток и снижением TUNEL-положительных клеток. Появление апоптотических маркеров не может быть заблокировано или снижено ингибиторами каспаз, кроме того, никаких данных не было зарегистрировано относительно наличия активности каспаз. Все это указывает на то, что в данном случае, скорее всего, реализуется каспазо-независимый процесс апоптоза. Индукция апоптозоподобной смерти под действием AmB была зафиксирована у *Candida albicans*. Маркерами апоптоза были: накопление АФК и фрагментация ядра. Индукция апоптоза AmB может происходить благодаря освобождению мембранных компонентов, в частности сфинголипидов. Метаболизм сфинголипидов связан с широким кругом клеточных активностей, включающих ответ на стресс, апоптоз, воспаление, регуляцию клеточным циклом и развитие опухоли.

У грибов известно два главных сфинголипида — дигидросфингозин и фитосфингозин, они вызывают накопление АФК и клеточную смерть с типичными признаками апоптоза у *Aspergillus nidulans*. Индукция апоптоза дигидросфингозином была метакаспазо-независимой, так как не было разницы с апоптотической смертью у мутанта casAΔ с делецией гена метакаспазы. Была показана связь индуцируемой дигидросфингозином гибели клетки с фитотоксичностью продуцируемого грибом AAL токсина. Этот токсин, образуемый *Alternaria alternata*, принадлежит к классу специфичных для хозяина грибных микотоксинов, структурно близких к сфинганину, предшественнику биосинтеза сфинголипидов у растений. AAL Токсин убивает клетки чувствительных растений-хозяев, индуцируя апоптотическую смерть. Апоптоз клеток растений являются стратегией, используемой патогенными грибами для ослабления растения и ускорения его гибели.

Новые данные показывают, что растения, в свою очередь, могут использовать апоптоз грибов для того, чтобы блокировать проникновение патогена путем секреции противогрибных компонентов, индукторов апоптоза. **Осмотин** — белок, участвующий в патогенезе табака, индуцирует апоптоз у *S. cerevisiae*. Эта индуцированная клеточная смерть зависит от АФК, так как блокирование продукции АФК спасает клетки от индуцируемой осмотином гибели.

К настоящему времени апоптоз, индуцируемый осмотином, был продемонстрирован у *S. cerevisiae*, хотя другие противогрибные пептиды из других организмов могут вызывать апоптоз у разных грибов. Сапонин растений **α-томатин** является противогрибным сесквитерпеновым гликозидом, образуемым томатами. Считалось, что α-томатин способствует гибели грибов из-за нарушения сборки мембран. Однако недавно было показано, что он индуцирует апоптотическую гибель клеток у патогена растений *Fusarium oxysporum*. Блокирование *de novo* синтеза белка с использованием циклогексимида снижало апотоз дозо-зависимым способом. Фунгицидная активность α-томатина супрессировалась ингибитором транспорта электронов в митохондриях олигомицином, предполагая роль митохондрий в этом процессе. Антиоксиданты (аскорбиновая кислота и диметилтиомочевина)

и ингибитор каспаз (Z-VAD-FMK) защищали клетки от апоптоза дозо-зависимым образом, что указывает на зависимость α-томатин-индуцируемой клеточной смерти у *F. oxysporum* от АФК и каспаз.

Сравнительно большое число продуцируемых грибами компонентов как вторичных метаболитов, так и пептидов могут вызывать апоптотическую смерть у грибов. **Ловастатин** является вторичным метаболитом, который образуют несколько мицелиальных грибов. Он широко известен как холестерол-понижающий препарат и ингибирует 3-гидрокси-3-метил-глутарил-CoA редуктазу. Кроме того, ловастатин является триггером апоптоза у клеток человека. В одном из ранних сообщений по апоптозу грибов показали индукцию апоптоза ловастатином у зигомицета *Mucor racemosus*. Подобный эффкт был получен и на аскомицетных грибах *Colletotrichum gloeosporioides* и *Botrytis cinerea*.

Изопреноид **фарнезол** секретируется как молекула кворум-сенсинга у *Candida albicans*. Он ингибирует переход дрожжевой стадии в мицелиальную с неограниченным ростом и делением клеток. У других грибов фарнезол индуцирует апоптоз. Клетки дрожжей, обработанные фарнезолом, показывают снижение скорости роста, накопление АФК и гиперполяризацию митохондриальной мембраны. У *A. nidulans* и *Fusarium graminearum* фарнезол вызывает остановку роста мицелия и появление апоптотических маркеров, включая накопление АФК, переход фосфатидилсерина из внутреннего в наружный слой цитоплазматической мембраны и быструю конденсацию и фрагментацию ДНК.

Белок PAF — богатый цистеином противогрибной белок, секретируется *Penicillium chrysogenum*. Белок ингибирует разные фитопатогенные и зоопатогенные грибы. У *A. nidulans* PAF индуцирует АФК-опосредуемый апоптоз, сопровождающийся гиперполяризацией плазматической мембраны, переходом фосфатидилсерина из внутреннего в наружный слой цитоплазматической мембраны и фрагментацией ДНК. Следует отметить, что апоптоз, вызванный у грибов большинством рассмотренных соединений, каспазо-зависим.

11.2.2. Роль автофагии в клеточной смерти у грибов

Автофагия грибов — это специфическая ЗГК типа II, которая отличается от апоптотической смерти рядом признаков и функций. Была продемонстрирована связь между автофагией и такими процессами, как развитие и патогенез у грибов.

Автофагия — это процесс неселективной деградации в эукариотической клетке. Автофагическая смерть характеризуется деградацией цитоплазматических компонентов до момента деградации ядра в отличие от апоптоза, где порядок событий обратный. Одним из маркеров автофагии является динамика реорганизации мембран, приводящая к формированию автофагосом. Гены автофагии действуют в каскаде слияний, контролирующих процесс инициации и «поедания». Эти молекулярные процессы обнаруживают высокую консервативность от дрожжей до человека. У дрожжей *S. cerevisiae* они связаны с дифференциацией, развитием (например, размножение и прорастание спор) и ответом на стресс. У дрожжей псевдогифальный рост и автофагия запускаются при недостатке азота, а ингибирование автофагии приводит к увеличению интенсивности псевдогифального роста.

Автофагия у мицелиальных грибов обычно индуцируется углеродным и азотным голоданием. Автофагия также связана с ростом, морфогенезом и развитием и играет роль в защите клеток от гибели. Автофагия грибов сопровождается быстрой гипервакуолизацией и укрупнением вакуолей. Сходно с другими организмами автофагия у грибов характеризуется присутствием автофагосом и контролируется рапамицинкиназой.

У грибов изучены два гена автофагии ортолога дрожжевых *ATG1* и *ATG8*. Дефекты по этим генам влияют на морфогенез и развитие. Например, делеция *mgatg1* или *mgatg8* у мутантов *Magnaporthe oryzae* показывает редукцию воздушного мицелия, нарушение конидиеобразования и задержку прорастания. Мутации по этим генам или их делеция вызы-

вает также снижение формирования репродуктивных органов, таких как протоперитециев у *P. anserina* и перитециев у *M. oryzae*. У *M. oryzae* делеция гена *MgATG8* предотвращает гибель споры, которая необходима для завершения ранних стадий инфицирования растения. Хотя аппрессории и образуются, они не могут проникнуть через кутикулу растения и мутантные штаммы *mgatg8* будут не патогенными. Мутант *Colletotrichum lindemuthianum* с делецией clk1 (гомолог *ATG1*) будет также иметь дефект, связанный с проникновением через кутикулу. Таким образом, опосредованная автофагией клеточная смерть может быть необходима для патогенеза растений у этих видов. У *P. anserina* автофагия индуцируется на ранних этапах реакции несовместимости (клеточной смерти). Выведение из строя гена ортолога *ATG1*, который важен для формирования автофагосом *P. anserina*, предотвращает автофагию; однако не влияет ни на клеточную гибель, ни на вакуолизацию, показывая, что у данного вида гриба эти процессы не зависят от автофагии.

Литература

Ванюшин Б. Ф. 2001. Апоптоз у растений // Усп. биол. химии. Т.41. С.3–38.

Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. 2004. Апоптоз одноклеточных: механизмы и эволюция. Обзор // Биохимия. Т.69. С.1301–1313.

Дьяков и др., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. 2005. Введение в генетику грибов. М.: Академия. 304 с.

Мажейка И.С., Кудрявцева О.А., Камзолкина О.В. 2011. Контроль продолжительности жизни у грибов и других организмов. Концепция весов // Журн. общ. биол. Т.72. No.4. С.243–268.

Манских В.Н. 2007. Пути гибели и их биологическое значение // Цитология. Т.49. No.11. С.909–915.

Москалев А. 2009. Новое в эволюционных представлениях о природе старения // Наука за продление жизни. Т.23. С.9-29.

Северин Ф.Ф., Скулачёв В.П. 2009. Запрограммированная клеточная смерть как мишень борьбы со старением организма // Успехи геронтологии. Т.22. С.37–48.

Скулачев В.П. 2001. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. Т.7. No.6. С.4–10.

Шемарова И.В. 2007. Пути передачи апоптотических сигналов в клетках низших эукариот // Цитология. Т.49. No.3. С.229–242.

Шемарова И.В. 2008. Регуляция продолжительности жизни у низших эукариот // Цитология. Т.50. No.8. С.647–662.

Alvers A.L., Fishwick L. K., Wood M.S., Hu D., Chung H.S., Dunn W.A., Aris J.P. 2009. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae* // Aging Cell. Vol.8. No.4. P.353–369.

Aung-Htut M.T., Lam Y.T., Lim Y-L., Rinnerthaler M., Gelling C.L., Yang H., Breitenbach M., Dawes I.W. 2013. Maintenance of mitochondrial morphology by autophagy and its role in high glucose effects on chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol.2013. Article ID 636287. 13 pages http://dx.doi.org/10.1155/2013/636287

Braun R.J., Westermann B. 2011. Mitochondrial dynamics in yeast cell death and aging // Biochemical Society Transactions. Vol.39. No.5. P.1520–1526.

Burtner C.R., Murakami C.J., Kennedy B.K., Kaeberlein M. 2009. A molecular mechanism of chronological aging in yeast // Cell Cycle. Vol.8. No.8. P.1256–1270.

Carmona-Gutierrez D., Eisenberg T., Büttner S., Meisinger C., Kroemer G., Madeo F. 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. Review // Cell Death and Differentiation. Vol.17. P.763–773.

Coppin E., Debuchy R., Arnaise S., Picard M. 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes // Microbiology and molecular biology reviews. Vol.61. No.4. P.411–428.

Drakulic T., Temple M.D., Guido R., Jarolim S., Breitenbach M., Attfield P.V., Dawes I.W. 2005. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Research. Vol.5. No.12. P.1215–1228.

Esser K, Tudzynski P., Stahl U, Kűck U. 1980. A model to explain senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina* by the action of plasmid like DNA // Molec. gen. Genet. Vol.178. P.213–216.

Fedorova N.D., Badger J.H., Robson G.D., Wortman J.R., Nierman W.C. 2005. Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi // BMC Genomics. Vol.6. P.177 (1-14).

Fröhlich K.U., Fussi H., Ruckenstuhl C. 2007. Yeast apoptosis – from genes to pathways // Semin Cancer Biol. Vol.17. P.112–121.

Glass N.L., Dementhon K. 2006. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi // Current Opinion in Microbiology. Vol.9. P.553–558.

González-Polo R-A., Boya P., Pauleaul A-L., Jalil A., Larochette N., Souquère S., Eskelinen E-L., Pierron G., Saftig P., Kroemer G. 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death // J. Cell Sci. Vol.118. No.14. P.3091–3102.

Gourlay C.W. and Ayscough K.R. 2005. A role for actin in aging and apoptosis // Biochemical Society Transactions. Vol.33. P.1260–1264.

Gredilla R., Grief J., Osiewacz H.D. 2006. Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina* // Experimental Gerontology. Vol.41. P.439–447.

Griffiths A.J.F. 1992. Fungal senescence // Annu. Rev. Genet. Vol.26. P.351–72.

Hamann A., Brust D., Osiewacz H.D. 2008. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing // Trends Microbiol. Vol.16. P.276–283.

Hamann A., Brust D., Osiewacz H.D. 2007. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina* // Molecular Microbiology. Vol.65. P.948–958.

Jamet-Vierny C., Rossignol M., Haedens V., Silar P. 1999. What triggers senescence in *Podospora anserina*? // Fungal Genetics and Biology. Vol.27. P.26–35.

Jazwinski S.M. 2000. Metabolic mechanisms of yeast ageing // Experimental Gerontology. Vol.35. P.671–676.

Jazwinski S.M., Egilmez N.K., Chen J.B. 1989. Replication control and cellular span // Experimental Gerontology. Vol.24. P.423-436.

Klinger H., Rinnerthaler M., Lam Y. T., Laun P., Heeren G, Klocker A, Simon-Nobbe B., Dickinson J.R, Dawes I.W., Breitenbach M. 2010. Quantitation of (a)symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells // Experimental Gerontology. Vol.45. No.7–8. P.533–542.

Klionsky D.J., Emr S.D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation // Science. Vol.290. No.5497. P.1717–1721.

Laun P., Heeren G., Rinnerthaler M., Rid R., Kössler S., Koller L., Breitenbach M. 2008. Senescence and apoptosis in yeast mother cell-specific aging and in higher cells: A short review // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1783. P.1328–1334.

Low C.P., Liew L. P., Pervaiz S., Yang H. 2005. Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. MiniReview // FEMS Yeast Research. Vol.5. P.1199–1206.

Lu B.C.K. 2006. [Programmed cell death in fungi. 9] // U. Kűes, R. Fischer (eds). The Mycota. Vol.1. 2nd ed. Growth, differentiation and sexuality. Berlin. Heidelberg. New York: Springer-Verlag. P.167–187.

Ludovico P., Rodrigues F., Almeida A., Silva M.T., Barrientos A., Côrte-Real M. 2002. Cytochrome *c* release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular Biology of the Cell. Vol.13. No.8. P.2598–2606.

Madeo F., Engelhardt S., Herker E., Lehmann N., Maldener C., Proksch A., Wissing S., Fröhlich K.-U. 2002. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine // Curr Genet. Vol.41. P.208–216.

Madeo F., Herker E., Wissing S., Jungwirth H., Eisenberg T., Fröhlich K.-U. 2004. Apoptosis in yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.7. P.655–660.

McMurray M.A., Gottschling D.E. 2004. Aging and genetic instability in yeast // Current Opinion in Microbiology. Vol.7. P.673–679.

Osiewacz H.D. 2002. Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi Review // Ageing Research Reviews. Vol.1. P.425–442.

Osiewacz H.D. 2003. [Aging and mitochondrial dysfunction in the filamentous fungus *Podospora anserine*] // T. Nyström, H.D. Osiewacz (eds.). Topics in Current Genetics. Vol.3. Model systems in Aging. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P.1–38.

Osiewacz H.D., Hamann A. 2006. [Senescence and longevity] // U. Kűes, R. Fischer (eds.). The Mycota. Vol.1. 2nd edn. Growth, differentiation and sexuality. Berlin. Heidelberg. New York: Springer-Verlag. P.189–200.

Osiewacz H.D., Kimpel E. 1999. Mitochondrial-nuclear interactions and lifespan control in fungi // Experimental Gerontology. Vol.34. P.901–909.

Osiewacz H.D., Scheckhuber C.Q. 2006. Impact of ROS on ageing of two fungal model systems: *Saccharomyces cerevisiae* and *Podospora anserina* // Free Radic Res. Vol.40. No.12. P.1350–1358.

Pollack J.K., Harris S.D., Marten M.R. 2009. Autophagy in filamentous fungi // Fungal Genetics and Biology. Vol.46. P.1–8.

Ramsdale M. 2006. [Programmed Cell Death and Apoptosis in Fungi. 7] // Alistair J.P., Brown (ed.). The Mycota XIII. Fungal Genomics. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P. 113–146.

Robson G.D. 2006. Programmed cell death in the aspergilli and other filamentous fungi // Medical Mycology September. Vol.44. S109–S114.

Scheckhuber C.Q., Erjavec N., Tinazli A., Hamann A., Nystöm T., Osiewacz H.D. 2007. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models // Nat. Cell Biol. Vol.9. No.1. P.99–105.

Sharon A., Finkelstein A., Shlezinger N., Hatam I. 2009. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. Review article // FEMS Microbiol Rev. Vol.33. P.833–854.

Shlezinger N., Goldfinger N., Sharon A. 2012. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: the benefits in filamentous species // Front. Oncol. Vol.2. P.97 (1–8).

Skulachev V.P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis // Apoptosis. Vol.11. P.473–485.

Smith D.L., Jr., McClure J.M., Matecic M., Smith J.S. 2007. Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins // Aging Cell. Vol.6. No.5. P.649–662.

Smith M.K., Bruhn J.N. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms // Nature. Vol.356. No.2. P.428–431.

Smith J.R., Rubenstein I. 1973. The Development of senescence' in *Podospora anserina* // J. General Microbiol. Vol.76. P.283–296.

Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Ben Younes A, Maiuri M.C., Lavandero S., Kroemer G. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? // Gerontology. Vol.54. No.2. P.92–99.

Westermann B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol.11. P.872–884.

Словарь основных терминов

Авирулентность — неспособность отдельных штаммов патогенных видов микроорганизмов вызывать заболевание.

Автофагия — процесс неселективной деградации в эукариотической клетке.

Агглютинация (лат. *agglutinatio*— приклеивание) — склеивание и выпадение в осадок из однородной взвеси бактерий, эритроцитов и др. клеток под действием специфических веществ — **агглютининов**, в роли которых могут, например, выступать антитела или лектины.

Адгезины (от лат. *adhaesio* — прилипание) — общее название специализированных поверхностных белков клеточных стенок, определяющих процесс адгезии. Примером адгезинов у дрожжей *Candida albicans* могут быть фимбрии.

Адгезивы — вещества, способные соединять материалы путем поверхностного сцепления.

Амилоиды — белково-полисахаридный комплекс, образующийся при нарушении обмена веществ и откладывающийся в виде **амилоидных фибрилл** в стенках сосудов, желез и т.д.

Амфипатичные вещества — вещества, обладающие одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами.

Анафаза А — стадия деления ядра с расхождением хроматид к полюсам деления посредством деполимеризации микротрубочек веретена деления, а **в анафазу В** —посредством расхождения полюсов деления, в последнем случае веретено деления максимально вытянутое.

Антероградный транспорт — транспорт от эндоплазматического ретикулума через аппарат Гольджи к лизосомам, эндосомам или клеточной поверхности. Транспорт в обратном направлении называется **ретроградным.**

Антипорт — котранспорт, при котором одно вещество перемещается против градиента своей концентрации, другое вещество движется в противоположном направлении по градиенту своей концентрации.

Апоптоз — регулируемый процесс программируемой клеточной гибели.

Апоптосома — крупная четвертичная белковая структура, формирующаяся внутри клетки в процессе апоптоза.

Аппрессорий — орган для прикрепления паразитических грибов к субстрату.

Архикарп — женский половой орган аскомицетов.

Ассимиля́ция — совокупность процессов анаболизма (биосинтеза) в живом организме.

Аэро́бы (от греч. αηρ — воздух и βιοζ — жизнь) — организмы, которые нуждаются в свободном молекулярном кислороде для получения энергии, необходимой для жизнедеятельности.

Броже́ние — процесс анаэробного расщепления органических веществ, преимущественно углеводов, происходящий под влиянием микроорганизмов или выделенных из них ферментов.

Вируле́нтность (от лат. virulentus — ядовитый) — количественное выражение патогенности данного штамма микроорганизма в отношении определенного вида животного или растения при определенных условиях естественного или искусственного заражения.

Вторично-активный транспорт — перенос через мембрану вещества против градиента его концентрации за счет энергии градиента концентрации другого вещества, создаваемого в процессе активного транспорта.

Вторичные мессенджеры или посредники — внутриклеточные вещества, концентрация которых строго контролируется гормонами, нейромедиаторами и другими неклеточными сигналами.

Гальванотропизм — биологическое явление реагирования организма на пропускание гальванического тока через окружающую среду, например, способность мицелия грибов направлять свой рост под влиянием слабого электрического тока.

Гемы — комплексные соединения порфиринов с двухвалентным железом.

Гликопротеины — гликозилированные белки.

Гломалин — гликопротеин, который образуется на гифах и спорах арбускулярных микоризообразующих грибов.

Глюканы — полисахариды, состоящие из мономеров D-глюкозы.

Гомологичные молекулы — молекулы имеющие общее происхождение и состоящие из одинаковых нуклеотидных последовательностей.

Гомотипичные — сходные симметричные органы/органеллы.

Десмопоры — микропоры в септе, через которые проходят цитоплазматические мостики (**плазмодесмы**), связывающие цитоплазму двух смежных клеток.

Дикариотизация — восстановление двуядерности в клетках аско- и базидиомицетов.

Диктиосома — составная часть комплекса Гольджи, система мембран, сложенных стопкой.

Диморфизм мицелиально-дрожжевой — способность гриба в одних условиях существовать в виде мицелия, а в других — в виде отдельных клеток (дрожжей).

Динактин — комплекс белков, связанных с динеином, который регулирует его свойства и обеспечивает связь с везикулами.

Динаминоподобные белки — крупные само-олигомеризующиеся ГТФазы, способные образовывать кольцевую структуру вокруг целевой мембраны, стягивать и разрезать эту мембрану при гидролизе ГТФ.

Динамины — ГТФазые белки, участвующие в эндоцитозе, отделении везикулы от родительской мембраны: плазмалеммы, ЭР и др.

Динеины и кинезины — группа моторных белков, способных перемещаться по поверхности микротрубочек цитоскелета, а **миозины** - по филаментам актина, и трансформирующих химическую энергию, содержащуюся в АТФ, в механическую энергию движения.

Дистальный (от лат. disto — отстою) — расположенный дальше от центра тела или его медианной плоскости.

Долипора — формирование вокруг порового канала долипоровой септы грибов вздутия (долипоровое утолщение).

Дрожжи — жизненная форма грибов, представленная отдельными почкующимися или делящимися клетками.

Дуплекс — структура, состоящая из двух закрученных в спираль антипараллельных полинуклеотидных цепей, имеющих направленность 5′→ 3′и 3′→ 5′.

Изотропный — имеющий однородные во всех направлениях свойства.

Инициали — клетки зародышевой ткани, обладающие способностью к продолжительному делению.

Интегрины — интегральные мембранные белки, которые перманентно прикреплены к плазматической мембране.

Интеркалярный рост (от лат. intercalarius — вставной, добавочный) вставочный рост — рост организма в длину посредством деления клеток ниже верхушки.

Интроны — участок ДНК, который является частью гена, но не содержит информации о последовательности аминокислот белка.

Кариогамия — слияние ядер.

Кариокинез — деление ядра.

Каспазы — семейство цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатка аспарагиновой кислоты.

Кина́зы (фосфотрансферазы) — ферменты, катализирующие перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на различные субстраты.

Кинетохоры — белковая структура на хромосоме, к которой крепятся волокна веретена деления во время деления ядра/клетки.

Клатрин (англ. *clathrin*) — покровный белок, основной компонент оболочки везикул, образующихся при рецепторном эндоцитозе.
Кортекс (cortex) клетки — периферическая зона клетки.
Кристы митохондрий — выросты внутренней мембраны митохондрий.
Кроссинговер (кроссовер) — процесс обмена участками гомологичных хромосом во время конъюгации в профазе I мейоза или митоза.
Ксенобиотики (от греч. Ξένος — чуждый и βίος — жизнь) — условная категория для обозначения чужеродных для живых организмов химических веществ, не входящих в биотический круговорот.
Ламины — ядерные промежуточные фибриллярные белки животных.
Лектины (от лат. *legere* — собирать) — белки, обладающие способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности клеток, в частности, вызывая их агглютинацию.
Лига́нд (от лат. *ligare — связывать*) — атом, ион или молекула, связанные с неким центром (акцептором).
Микопаразиты — микофильные грибы, паразитирующие на других грибах.
Митоптоз — запрограммированная гибель митохондрий.
Митофагия — утилизация митохондрий.
Митохор — белки, участвующие в слиянии и делении митохондрий.
Монофилетические виды организмов — виды, происходящие от общего предка.
Морфогенез — процесс возникновения новых структур и изменения их формы в ходе индивидуального развития организмов.
Никомицины — антибиотики, образующиеся стрептомицетом и обладающие фунгицидным и инсектицидным действием.
Нуклеация — этап зарождения микротрубочки.
Нуклеосома —- структурная часть хромосомы, образованная совместной упаковкой нити ДНК с гистоновыми белками H2A, H2B, H3 и H4.
Облигатные (строгие) аэробы (например, некоторые роды дрожжей) не могут жить и размножаться в отсутствие молекулярного кислорода, поскольку используют его в качестве акцептора электронов.
Олиготрофы — организмы, обитающие на субстратах с низким содержанием питательных веществ.
Органоптоз — запрограммированная гибель органов.
Ортологичные гены (англ. orthologous genes) — гомологичные гены филогенетически родственных организмов, разошедшихся в процессе видообразования; гены, которые у различных видов произошли от общего предшественника и передавались вертикально в эволюции.
Парентосома — мембранная структура, окружающая долипору у базидиальных грибов. Может быть перфорированная и неперфорированная.
Пексофагия — деградация пероксисом.
Плазмогамия — слияние цитоплазмы клеток, обычно цитоплазмы гамет при оплодотворении.
Полиоксины представляют собой водорастворимые амфотерные вещества, содержащие урацил, они встраиваются в активный центр хитинсинтазы, ингибируя синтез хитина.
Поляризованный рост — направленный рост.
Полярисома — мультибелковый комплекс, участвующий в регуляции перемещения актинового цитоскелета и аппарата секреции, необходимого для поляризованного роста грибов.
Проксимальный (от лат. proximus — ближний) — расположенный ближе к центру тела или к его медианной плоскости
Проппины семейство белков участвующих в автофагии.
Профилин — актин-связывающий белок, участвующий в обеспечении динамической нестабильности и реструктуризации актинового цитоскелета.
Псевдогифа состоит из цепочки почкующихся клеток, которые остаются соединенными между собой.

Проапоптотические факторы — факторы, которые приводят к апоптозу.

Репликативное или митотическое старение характеризуется ограниченным количеством клеточных делений при экспоненциальном росте колонии, сопровождающимся остановкой роста, прекращением деления и смертью либо старых клеток у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, либо апикальных у мицелиальных грибов (*Podospora anserina)*.

Септины — семейство ГТФ-связывающих белков, которые являются компонентами цитоскелета клеток грибов и животных и представляют собой пучки неполярных филаментов, промежуточных по толщине между микротрубочками и филаментами F-актина.

Симпорт — сопряженный транспорт двух веществ через мембрану в одном направлении, при котором одно вещество перемещается по градиенту своей концентрации, а другое вещество движется против своего градиента

Соленоиды — суперспиральные структуры ДНК с 6 нуклеосомами на оборот.

Соматическая клетка — любая неполовая клетка многоклеточного организма.

Сплайсинг (от англ. splice — сращивать или склеивать концы чего-либо) — процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК.

Спредирование клеток — распластывание клеток.

Старение применительно к высшим эукариотическим организмам — процесс прогрессивного снижения способности противостоять стрессу, опасности и болезням.

Стресс (от англ. *stress* — давление, нажим, напор; гнёт; нагрузка; напряжение) — неспецифическая (общая) реакция организма на воздействие (физическое или психологическое), нарушающее его гомеостаз.

Субдомен — домен уровнем ниже основного.

Сумоилирование (англ. **sumoylation)** [англ *s(mall) u(biquitin-related) mo(difier)* — малый убиквитин-родственный модификатор] — посттрансляционная модификация белка, заключающаяся в ковалентном связывании эпсилон-аминогруппы лизина, расположенной на С-конце полипептида, с белком SUMO, представляющим из себя компонент убиквитиновой системы.

Теломеры — концевые участки хромосом.

Тигмотаксис — реакции (выражающиеся в направлении движения и роста) на одностороннее раздражение прикосновением.

Транспорт активный — транспорт против электрохимического градиента, происходит с затратой энергии.

Транспорт пассивный — транспорт по градиенту концентраций или градиенту электрического заряда.

Тредмиллинг — движение микротрубочки/микрофиламента в результате одновременного наращивания одного конца и диссоциации другого конца микротрубочки или микрофиламента актина.

Тропомиозин — фибриллярный белок (70 кДа), состоящий из двух перевитых α-спиралей. Тропомиозин связывается в единый комплекс с F-актином в области изгиба молекулы, обеспечивая его стабильность.

Убиквитинирование — ферментативная посттрансляционная модификация белка, мечение белка убиквитином.

Унипорт — перенос растворенного вещества с одной стороны мембраны на другую, осуществляемый по механизму простой или облегченной диффузии.

Фагофор — место формирования автофагосомы из мембраны вакуоли.

Факультативные аэробы — организмы, прекрасно живущие и размножающиеся при достаточном доступе кислорода воздуха, но не гибнущие и при отсутствии кислорода.

Феноптоз — запрограммированная гибель организма.

Филасомы — эквивалент актиновых заплаток, участвующих в эндоцитозе у грибов.

Фолдинг — процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру.

Формин — мультидоменный опорный белок, участвующий в полимеризации актина, и связанный с быстрорастущим концом актиновых филаментов.

Фрагмопласт — цилиндрическая структура, состоящая из микротрубочек и микрофиламетов, возникающая в ранней телофазе митоза между двумя дочерними ядрами; в центре фрагмопласта находятся пузырьки Гольджи, содержащие пектины.

Хиазма — в генетике точка, в которой две гомологичные несестринские хроматиды обмениваются генетическим материалом в ходе кроссинговера в течение мейоза.

Хитосомы — везикулы, транспортирующие фермент хитинсинтазу в зимогенной форме.

Хронологическое старение — явление потери жизнеспособности индивидуальных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании в стационарной фазе роста.

Центромера — участок хромосомы, характеризующийся специфической последовательностью нуклеотидов и структурой. Центромера принимает участие в соединении сестринских хроматид, формировании кинетохора, конъюгации гомологичных хромосом и вовлечена в контроль экспрессии генов.

Цитокинез — деление тела эукариотической клетки.

Шапероны (англ. *chaperones*) — класс белков, главная функция которых состоит в обеспечении правильного сворачивания полипептидных цепей, восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также в образовании и диссоциации белковых комплексов.

Эквационное деление (лат. aequus равный) — второе деление мейоза, происходящее без предварительного удвоения числа хромосом и завершающееся формированием клеток с гаплоидными ядрами.

Экзосома — мембранная органелла, которая образуется внутри клетки, транспортируется к цитоплазматической мембране и освобождается во внеклеточное пространство путем экзоцитоза.

Экзоциста — белковый комплекс, принимающий участие в стыковке секреторных везикул с цитоплазматической мембраной.

Экзоцитоз (от др.-греч. ἔξω «вне, снаружи» и κύτος «клетка») — клеточный процесс у эукариот, при котором внутриклеточные везикулы (мембранные пузырьки) сливаются с внешней клеточной мембраной.

Эндосимбиоз — взаимно выгодное сосуществование организмов, при котором один из организмов обитает внутри другого.

Эндосома — мембранная внутриклеточная органелла, один из типов везикул, образующихся при слиянии и созревании эндоцитозных пузырьков.

Эндоцитоз (англ. *endocytosis*) — процесс захвата (интернализации) внеклеточного материала клеткой, осуществляемый путём образования мембранных везикул.

Энергизованность мембраны возможность использования потока ионов через мембранный бислой для совершения работы

Эписомы — генетические элементы, которые могут существовать в клетке независимо от хромосомы.

Содержание

Предисловие ... 3

Глава 1. Плазматическая мембрана грибов (плазмалемма) ... 5
1.1. Общая характеристика ... 5
1.2. Функции плазмалеммы ... 5
1.3. Белки плазмалеммы ... 6
1.4. Липиды плазмалеммы ... 7
1.5. Пассивный и активный транспорт в мембранах ... 9
Литература ... 12

Глава 2. Клеточная стенка грибов ... 13
2.1. Введение. Общая характеристика клеточной стенки ... 13
2.2. Функции клеточной стенки ... 13
2.3. Строение клеточных покровов у грибов ... 14
2.4. Структура и состав клеточной стенки грибов ... 16
2.4.1. Углеводы, участвующие в построении клеточной стенки грибов ... 17
2.4.1.1. Хитин ... 17
2.4.1.2. Хитозан ... 18
2.4.1.3. Глюканы ... 18
2.4.1.4. Маннаны ... 18
2.4.2. Белки ... 19
2.4.3. Внеклеточный чехол (капсула) или внеклеточный слизистый материал ... 23
2.4.4. Характеристика минорных компонентов клеточной стенки грибов ... 25
2.5. Биосинтез клеточной стенки грибов ... 26
2.5.1. Синтез хитина ... 26
2.5.2. Синтез глюканов ... 28
2.5.3. Синтез гликопротеинов ... 29
2.5.4. Генетический контроль биосинтеза клеточной стенки ... 29
2.6. Динамика синтеза и преобразования клеточных покровов в процессе морфогенеза ... 29
2.7. Участие клеточных стенок в установлении и развитии патогенных и симбиотических связей между грибами и другими организмами ... 31
2.8. Сигнальные пути сборки клеточной стенки и ответ на стресс ... 32
2.9. Химический состав клеточной стенки, таксономическое положение и эволюция грибов ... 33
Литература ... 35

Глава 3. Септы и цитокинез у грибов ... 38
3.1. Общие сведения о септе и цитокинезе ... 38
3.2. Структура септального аппарата у грибов ... 39
3.3. Функции септы и ассоциированных с ней структур ... 44
3.4. Септирование и цитокинез у грибов ... 46

3.4.1. Выбор места септирования ... 47
3.4.1.1. Выбор места септирования у дрожжей ... 47
3.4.1.2. Септирование мицелиальных грибов ... 49
3.4.2. Формирование белкового комплекса, актомиозинового кольца и септы у разных модельных видов грибов ... 50
3.4.3. Образование долипоровой септы и парентосомы ... 54
Литература ... 54

Глава 4. Апикальный рост и апикальное тельце или Spitzenkörper ... 56
4.1. Общие представления о морфогенезе и типах роста у грибов ... 56
4.2. Организация и динамика апикального тельца или Spitzenkörper ... 58
4.2.1. Роль цитоскелета в сборке и функционировании апикального тельца ... 62
4.2.2. Сравнение структуры апикального тельца грибов с аналогичными структурами других эукариот ... 63
4.2.2.1. Поляризованный рост ризоидов *Chara* ... 63
4.2.2.2. Поляризованный рост оомицетов и пыльцевых трубок ... 63
4.3. Онтогенез Spitzenkörper и факторы, создающие полярность у грибов ... 64
4.3.1. Онтогенез Spitzenkörper ... 64
4.3.2. Факторы, создающие полярность у грибной клетки ... 65
4.3.2.1. Сигнальный фактор полярности Cdc42 ... 65
4.3.2.2. Полярисома ... 65
4.3.2.3. Экзоциста и другие белковые комплексы ... 66
4.4. Вклад полярисомы, экзоцисты и апикального тельца в поляризованный рост грибов ... 67
4.5. Модели морфогенеза гифы и Spitzenkörper ... 71
4.6. Современные представления о поляризованном росте мицелиальных грибов ... 75
Литература ... 76

Глава 5. Цитоскелет грибной клетки ... 78
5.1. Микротрубочковый цитоскелет ... 78
5.1.1. Структура и зарождение/нуклеация микротрубочек ... 78
5.1.2. Функции и распределение в клетке грибов ... 81
5.1.3. МТ-зависимые моторные белки ... 83
5.2. Актиновый цитоскелет ... 85
5.2.1. F-актин. Организация, нуклеация и функции ... 85
5.2.2. Распределение актин-содержащих структур у дрожжей *Saccharomyces cerevisia* ... 89
5.2.3. Миозины, актин-зависимые моторные белки ... 90
5.3. Промежуточные филаменты - септины ... 90
5.3.1. Общие представления о структуре и функциях септинов ... 90
5.3.2. Септины *Saccharomyces cerevisiae.* Структура и функции ... 91
5.3.3. Септины *Candida albicans.* Локализация и функции ... 95
Литература ... 98

Глава 6. Эндомембранная система грибной клетки ... 101
6.1. Биологические мембраны ... 101
6.2. Секреторный путь и его органеллы ... 102
6.2.1. Эндоплазматический ретикулум ... 103
6.2.2. Эквивалент аппарата Гольджи ... 106
6.2.3. Транспортные везикулы и экзосомы ... 108
6.3. Эндоцитозный путь и его органеллы ... 110
6.3.1. Эндосомы (ранние и поздние), мультивезикулярные тела ... 110

6.4. Вакуоли ... 112
6.4.1. Морфология вакуолей ... 112
6.4.2. Наследование вакуолей ... 115
6.4.3. Функции ... 116
6.4.3.1. Клеточный гомеостаз ... 116
6.4.3.2. Гидролитический компартмент ... 117
6.4.3.3. Транспорт питательных веществ на длинные дистанции ... 117
6.4.4. Автофагия и автофагосомы ... 118
Литература ... 119

Глава 7. Пероксисомы грибов ... 122
7.1. Общие сведения ... 122
7.2. Динамика пероксисом (биогенез и деградация) ... 123
7.2.1.Биогенез ... 123
7.2.2. Деление пероксисом у грибов ... 126
7.2.3. Деградация пероксисом ... 127
7.2.4. Движение и наследование пероксисом дрожжей ... 128
7.2.5. Функции пероксисом ... 129
7.2.5.1. Общие функции ... 130
7.2.5.2. Специфические функции ... 130
7.3. Тельца Воронина ... 131
7.3.1. Морфология и структура ... 132
7.3.2. Биогенез ... 133
7.3.3. Функции ... 135
Литература ... 136

Глава 8. Митохондрии и гидрогеносомы ... 139
8.1. Общие представления и функции ... 139
8.2. Морфология и динамика митохондрий (слияние и деление) ... 141
8.3. Движение и наследование митохондрий между материнской и дочерней клетками ... 144
8.4. Геном митохондрий ... 145
8.5. Дыхательная цепь митохондрий ... 146
8.5.1. Дыхательные комплексы основного электрон-транспортного пути у грибов ... 148
8.5.1.1. Комплекс I ... 148
8.5.1.2. Комплекс II ... 148
8.5.1.3. Комплекс III ... 149
8.5.1.4. Комплекс IV ... 150
8.5.2. Альтернативная НАДН:убихинон оксидоредуктаза у грибов ... 151
8.5.3. Альтернативная оксидаза у грибов ... 152
8.6. Митофагия у дрожжей ... 153
8.7. Роль митохондрий в апоптозе. Митоптоз. ... 154
8.8. Связь митохондрий с органеллами клетки ... 155
8.9. Гидрогеносомы ... 156
Литература ... 157

Глава 9. Ядерный аппарат. Митоз. Мейоз ... 160
9.1. Общие сведения ... 160
9.2. Структура ядра ... 162
9.2.1 Ядерная оболочка и поры ... 162
9.2.2. Хроматин и хромосомы ... 164
9.2.2.1. Нуклеиновые кислоты. Транскрипция. Трансляция. ... 165

9.2.2.2. Гистонные белки в формировании нуклеосом. Микрофибриллы хроматина 165
9.2.2.3. Хромосомы 166
9.2.2.4. Негистонные белки 168
9.2.3. Ядрышко 169
9.3. Полярное тело веретена 169
9.3.1. Общие сведения 169
9.3.2. Структура ПТВ 170
9.3.3. Компоненты ПТВ 170
9.3.4. Удвоение ПТВ 171
9.3.5. Мейотическое и митотическое ПТВ 172
9.4. Клеточный цикл 172
9.5. Особенности митоза у грибов 174
9.6. Жизненные циклы грибов, ядерный цикл и место мейоза. 177
9.7. Мейоз 179
9.7.1. Кариогамия-Профаза I. Образование пар и синапсис 179
9.7.2. Метафаза-анафаза I 182
9.7.3. Мейоз II 182
Литература 182

Глава 10. Метаболизм 186
10.1.Общие представления о метаболизме 186
10.2. Метаболизм углеводов у грибов 187
10.2.1. Метаболизм глюкозы у грибов 187
10.2.1.1. Катаболизм глюкозы у грибов 189
10.2.1.1.1. Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, гексозомонофосфатный путь, путь Энтнера Дудорова) 189
10.2.1.2.2. Метаболизм пирувата, цикл трикарбоновых кислот 191
10.2.1.2. Катаболизм глюкозы у дрожжей в анаэробных условиях (спиртовое брожение). 193
10.2.2. Глиоксилатный цикл 193
10.2.3. Особенности метаболизма дрожжей 194
10.2.4. Метаболизм трегалозы 196
10.2.5. Метаболизм гликогена 197
10.3. Метаболизм полиолов 197
10.4. Метаболизм липидов у грибов 199
10.4.1. Метаболизм триацилглицеринов 199
10.4.1.1. Биосинтез триацилглицеринов 199
10.4.1.2. Биогенез липидных тел. 200
10.4.1.3. Гидролиз триацилглицерина 201
10.4.2. Жирные кислоты 201
10.4.2.1. Биосинтез жирных кислот 202
10.4.2.2. β-Окисление жирных кислот 204
10.5. Метаболизм азота 205
10.5.1. Ассимиляция неорганических источников азота 205
10.5.2. Метаболизм аминокислот 206
10.5.3. Мочевина 209
Литература 209

Глава 11. Старение и апоптоз ... 213
11.1. Старение грибов (хронологическое и репликативное) ... 213
11.1.1 Репликативное старение *Saccharomyces cerevisiae* ... 214
11.1.2. Репликативное старение *Podospora anserina* ... 215
11.1.3. Распространение и значение репликативного старения у грибов ... 216
11.2 Запрограммированная гибель клеток ... 217
11.2.1. Апоптоз у грибов ... 217
11.2.1.1. Черты апоптоза у *Saccharomyces cerevisiae* ... 217
11.2.1.2. Старение и апоптоз у *Podospora anserina* ... 219
11.2.1.3. Апоптотическая сеть у грибов ... 219
11.2.1.4. Роль апоптоза в развитии грибов ... 222
11.2.1.5. Индукторы апоптоза ... 223
11.2.2. Роль автофагии в клеточной смерти у грибов ... 226
Литература ... 227

Словарь основных терминов ... 230